

ヒストンH2A分子表面の解析

| | |
|--------|---|
| 著者 | 岡田 裕介 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/40168 |

修士論文

ヒストン H2A 分子表面の解析

東北大学大学院薬学研究科
生命薬学専攻 遺伝子薬学分野

岡田 裕介

目次

| | |
|---|----|
| 第1章 要旨 | 2 |
| 第2章 序論 | 4 |
| 第1節 本研究の目的 | |
| 第2節 クロマチン構造とヌクレオソーム構造 | |
| 第3節 GLASP 解析 | |
| 第4節 ヒストンバリエント H2AZ (Htz1) | |
| 第3章 Htz1 と H2A において共通な機能を持つ領域の同定 | 10 |
| 第1節 Htz1 と H2A において共通な機能を持つ領域のスクリーニング | |
| 第2節 acidic patch 周辺領域への相互作用因子の推測 | |
| 第3節 H2A 点変異体の DNA 修復における機能の解析 | |
| 第4章 二重変異体解析による致死性を示す原因の推測 | 30 |
| 第1節 SWR1 complex との二重変異体解析 | |
| 第2節 プロモーター領域への SWR1 complex の集積に必要な因子との二重変異体解析 | |
| 第3節 INO80 complex との二重変異体解析 | |
| 第5章 総括 | 37 |
| 第6章 実験材料及び方法 | 43 |
| 第1節 出芽酵母 | |
| 第2節 培地 | |
| 第3節 プラスミド | |
| 第4節 破壊株の作製 | |
| 第5節 感受性試験 | |
| 第6節 細胞周期同調 | |
| 第7節 FACSscan | |
| 第8節 Western blotting | |
| 第9節 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法による DNA 修復解析 | |
| 第10節 MNase を用いたクロマチン構造解析 | |
| 謝辞 | 55 |
| 参考文献 | 56 |

第1章 要旨

【背景】真核生物のゲノム DNA は、核内でクロマチンと呼ばれるタンパク質複合体として高度に折りたたまれて存在している。クロマチン構造の基本単位であるヌクレオソームはひとつの (H3-H4)₂ 四量体と、二つの H2A-H2B 二量体から構成されるヒストン八量体に DNA が巻きついた構造をしている。ヌクレオソーム構造は DNA 結合性タンパク質の DNA への機能的相互作用に阻害的に働くため、その構造の破壊と再形成が核内の DNA 介在反応に必要とされる。これを主に行うのがヒストンシャペロン、ATP 依存性リモデリング因子、ヒストン修飾酵素、ヒストンバリエントなどのクロマチン関連因子である。

ヒストン H2A のバリエントである Htz1 のアミノ酸配列はヒストン H2A と約 60% が相同であり、Htz1 特有の機能の他に H2A と Htz1 に共通の機能の存在が予想される。しかし、これまで両者の違いについての多くの研究はなされてきたが、両者の共通の機能についてはほとんど研究されていない。そこで本研究では、H2A と Htz1 において共通の機能を担うと予測される H2A と Htz1 の分子表面を同定し、その表面の機能を解析した。

【結果】

1. Htz1 と H2A において共通な機能を持つ領域のスクリーニング

2 種類のヒストン H2A の網羅的なアラニン置換点変異体ライブラリーが樹立されている。ひとつはヌクレオソーム構造の表面に位置するアミノ酸を置換したもので (87 株)、これらの変異体ではクロマチン関連因子との結合の低下が想定される。もうひとつはヌクレオソームの構造中に埋もれたアミノ酸、すなわち DNA とヒストン H2A との相互作用、ヒストン H2A と H2B、H3、H4 などのヒストン間の相互作用に関わるアミノ酸を置換したライブラリーで (25 株)、それぞれの変異体でヌクレオソーム中のヒストン H2A サブユニットの解離と再会合の異常が想定される。ヒストン H2A と Htz1 に共通した機能が存在するかどうかを調べる目的で、*htz1* 欠損と H2A 点変異体の二重変異株を系統的に作製し、それらの二重変異株の致死性を指標としたスクリーニングを行なった。

ヒストン H2A 点突然変異体 112 株をスクリーニングした結果、H2A-R30A、-E57A、-E65A、-L66A、-D73A、-E93A、-L94A、-I103A、-I112A 及び -L116A 変異体が単独の点変異体では、致死とはならないが *htz1* の完全欠損時に致死となり、H2A-F26A、-R43A、-G68A、-N69A、-R78A、-I79A は増殖能が著しく低下した (下線はヌクレオソーム中に埋もれたアミノ酸)。

これらのアミノ酸残基は、出芽酵母およびヒトのヒストンH2AとHtz1 の間で保存された共通のアミノ酸であり、生物種を超えてヒストンH2AとH2Aバリエーションに共通する機能を発揮する際に利用されるアミノ酸残基であることが示唆された。ヌクレオソーム中に埋もれた3つのアミノ酸残基H2A-R30、-G68、-R78はDNAと相互作用しうる部位に存在し、ヌクレオソーム構造変換の過程でこれらのアミノ酸がヒストンH2A-H2BあるいはHtz1-H2B二量体とDNAとの相互作用を制御することが示唆された。

H2A-R30を除き*htz1*完全欠損株との二重変異で致死となるアミノ酸残基は全てヌクレオソームの表面上の3カ所にマッピングされた。それらは、acidic patch周辺領域(H2A-E57、-E65、-L66、-D73、-E93、-L94)、ヒストンH2A-H4相互作用領域(H2A-I103)及び、ヒストンH2AのC末端のH3、H4相互作用領域(H2A-I112、-L116)である。H2A-I103、-I112、-L116はヌクレオソームの表面に存在するが他のヒストンサブユニットと相互作用する側面も有している。一方、acidic patch領域はヌクレオソーム構造上で完全に露出し、クロマチン制御因子の結合領域になりうることが想定される。

2. 二重変異体解析による致死となる原因の推測

Htz1は、Swr1複合体によってクロマチンに組み込まれる。*SWR1*遺伝子を破壊したときにも、*htz1*と合成致死になるH2A点変異体は致死性や増殖能の低下を示した。Htz1は、特にプロモーター領域に多く存在するという特徴をもつ。Swr1複合体のひとつのサブユニットにBdf1(ヒトでは基本転写因子TFIIDのサブユニット)があり、*BDF1*が欠損するとこれらのH2A点変異体は致死になった。Htz1のプロモーター領域へのターゲティングは*bdf1*株で低下するため、細胞内にHtz1が存在するだけでなく、それがプロモーター領域に組み込まれることが、H2A変異体の場合には特に重要であることが示唆された。

【考察】

野生株だけでなくH2A変異体でもプロモーター領域に組み込まれたHtz1が、DNA相互作用領域、Htz1-H4相互作用領域、Htz1-(H3-H4)₂相互作用領域、および露出領域でクロマチン制御因子との相互作用を通じ、制御を行うことが重要であり、Htz1の機能をH2A変異体では代行できないと考えられる。逆に、*htz1*欠損は致死ではないことから、転写制御においてヒストンH2AがHtz1の機能を部分的に代行できると考えられる。

第2章 序論

第1節 本研究の目的

ヒストン H2A のバリエーションである Htz1 のアミノ酸配列はヒストン H2A と約 60%が相同であり、Htz1 特有の機能の他に、H2A と Htz1 に共通の機能の存在が予想される。しかし、これまで両者の違いについての多くの研究はなされてきたが、両者の共通の機能についてはほとんど研究されていない。H2A と Htz1 に共通の機能は、進化のなかで生まれたヒストンバリエーションにも備えるべき H2A との共通の機能であると考えられ、両者の重要な機能であると推測できる。

そこで本研究では、H2A と Htz1 において共通の機能を担うと予測される H2A と Htz1 の分子表面の同定し、その表面の機能を解析することで、H2A と Htz1 に共通の機能の解明を目指した。

第2節 クロマチン構造とヌクレオソーム構造

真核生物のゲノム DNA は、核内でクロマチンというタンパク質複合体によって高度に折りたたまれて存在している。クロマチン構造の基本単位であるヌクレオソームはひとつの $(H3-H4)_2$ 四量体が中心にあり、外側に二つの H2A-H2B 二量体が結合したヒストン八量体に DNA が巻きついた構造をしている (Fig. 1)。核内では、染色体は直径 30 nm の繊維として存在している。これは 11 nm 繊維と呼ばれるヌクレオソームが数珠状につながったものがらせん構造をとっているためである。しかし、クロマチンの構造は均一ではなくユークロマチン・ヘテロクロマチン、テロメア、セントロメア、ribosomal DNA (rDNA) 領域などの特殊なクロマチン構造を形成する領域が存在する。

ヌクレオソーム構造は DNA 結合性タンパク質の DNA への機能的相互作用に阻害的に働くため、その構造の破壊と再形成が核内の DNA 介在反応に必要とされる。それを制

御するのはクロマチン関連因子と呼ばれるヒストンシャペロン、ATP 依存性リモデリング因子、ヒストン修飾酵素、および H2A.Z を含むヒストンバリエーションなどである。

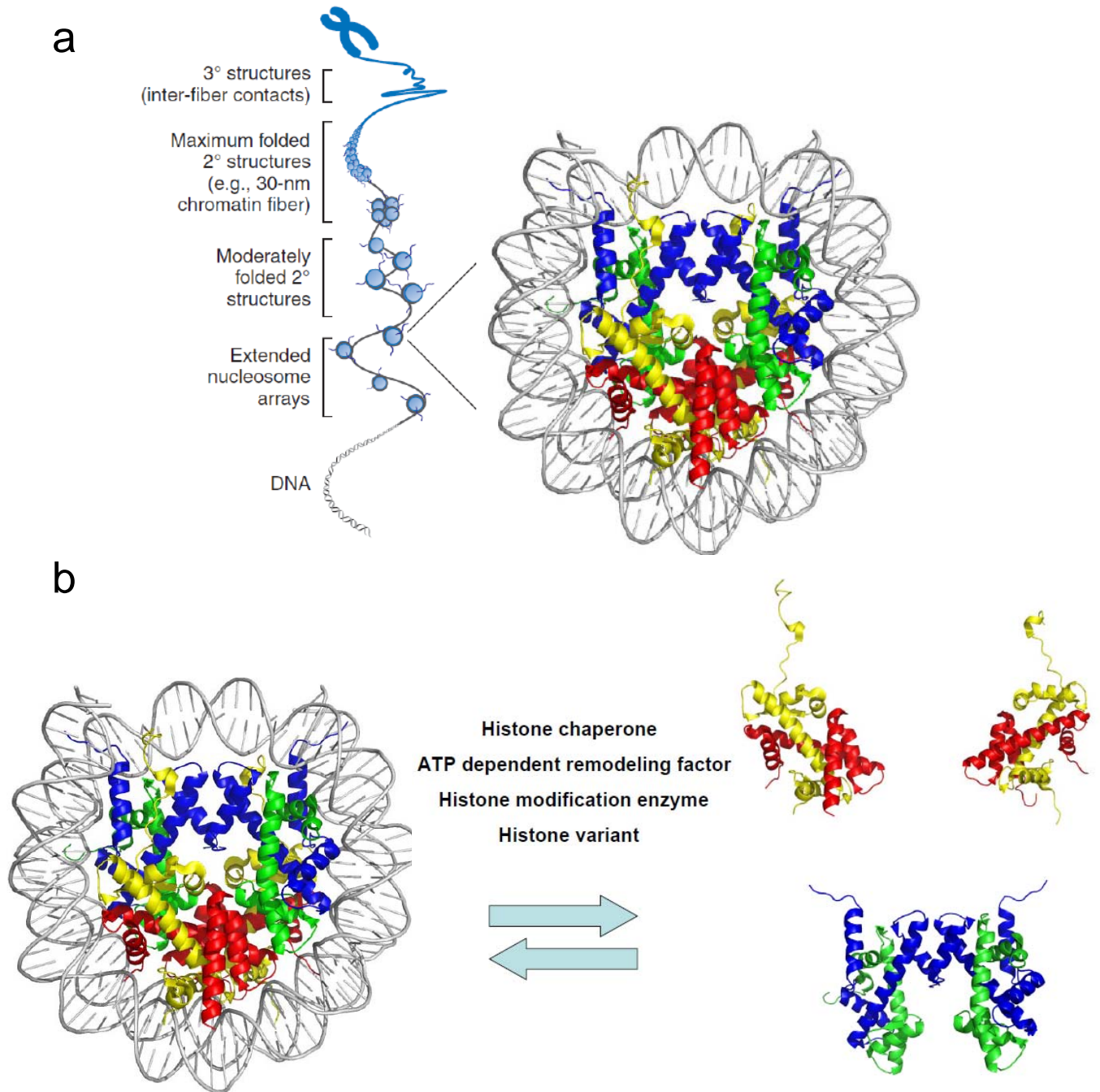


Fig. 1 クロマチン構造とヌクレオソーム構造

a) 様々なレベルで折りたたまれたクロマチン構造(左)とその基本単位であるヌクレオソーム構造(右)
H2A(黄)、H2B(赤)、H3(青)、H4(緑)、DNA(灰色)

b) ヌクレオソーム構造変換は様々な因子によって行われ、ヌクレオソーム構造の破壊と再形成により
DNA が露出され、核内の DNA 介在反応が起こる。

第3節 ヒストンの GLASP および GLAMP 解析

ヌクレオソームを構成するタンパク質は、4 種類のヒストン (H2A、H2B、H3、H4) と呼ばれる塩基性のタンパク質である。これらのヒストンは、ヌクレオソームのコアを形成するために、ヌクレオソームとヌクレオソームの間のリンカー領域に結合するリンカーヒストン (H1) と区別して、コアヒストンと呼ばれる。これら 4 種類のコアヒストンはすべての真核生物において保存されており、その保存度は真核生物のタンパク質中でも極めて高い。しかし、コアヒストンの各アミノ酸残基がどのように核内反応に関与するかは明らかとなっていない。そこで、コアヒストンの機能表面を包括的に理解するため、コアヒストンの分子表面を二種類に分類した。一つはヌクレオソームの表面に露出するアミノ酸残基であり、もうひとつはヌクレオソーム構造の中ではその構造の内部に埋もれているアミノ酸残基がある。前者はクロマチン関連因子群との相互作用が可能な表面であり、後者は DNA・ヒストン、ヒストン-ヒストン、個々のヒストン内部の相互作用に関与するアミノ酸残基が該当する。前者に分類される 320 個の各アミノ酸をアラニンに点変異させたヒストンを持つ出芽酵母コアヒストンアラニン置換ライブラリーが樹立され、GLlobal Analysis of Surfaces by Point mutation (GLASP) と呼称される戦略による初期のスクリーニングが行われた (Matsubara et al ., 2007)。

この GLASP 解析で、転写開始に関与する変異を評価するアッセイ系である Suppressor of Ty (Spt) 表現型、転写伸長段階を阻害することが知られる 6-azauracil (6AU) 感受性、複製阻害剤である hydroxyurea (HU) 感受性および DNA アルキル化剤であり DNA に二本鎖切断などの傷害を誘発する methylmethanesulfonate (MMS) 感受性が検定され、それぞれ転写開始、転写伸長、DNA 複製および DNA 修復に関与するヌクレオソーム上に露出している機能表面が同定された (Fig. 2)。

後者に該当する 112 個のアミノ酸残基についても GLlobal Analysis of Mutual

interaction surface of multi-subunit protein complex by Point mutation (GLAMP) と命名した戦略により、各アミノ酸をアラニンに点変異させたヒストンを持つ出芽酵母コアヒストンアラニン置換ライブラリーが構築された（東京大学の堀越博士）。現在、GLASP と同様の戦略を用いた解析を堀越博士との共同研究で GLAMPライブラリーに対しても行なっている。本研究では ヒストンのGLASP (87 個) および GLAMP (25 個) 解析のため作製した 112 個のヒストン H2A に対する網羅的な点突然変異ライブラリーを駆使して研究を進めた。

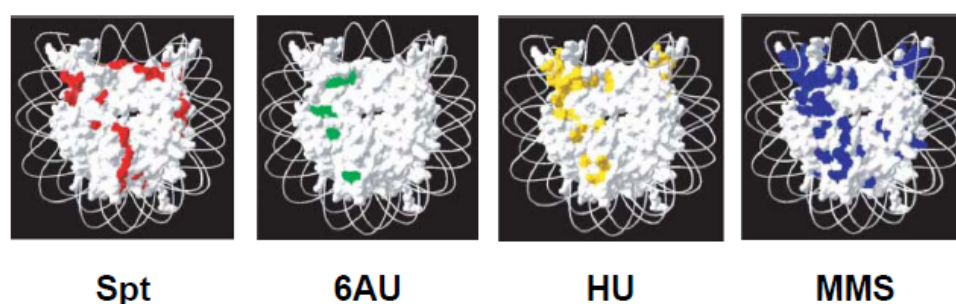


Fig. 2 GLASP 解析

GLASP 解析によって明らかになった各種反応に利用される機能表面 (Matsubara et al ., 2007 より引用)

第4節 ヒストンバリエント H2AZ (Htz1)

遺伝子発現や DNA 介在反応を制御するために、ヌクレオソーム間やヌクレオソーム中のヒストンと DNA 間およびヒストンとヒストン間の相互作用を変化させる必要があり、そのクロマチン・ヌクレオソーム構造変換機構のひとつに、主要なヒストンとヒストンバリエントとの交換反応がある。

細胞周期の S 期のみで DNA 複製と共役して合成される主要なヒストンとは対照的に、ヒストンバリエントは、細胞周期を通じて合成される。ヒストンバリエントは主に、ヒストン H3 と H2A に存在し、H3 バリエントに関しては、ヒストン H3.3 やセ

ントロメア特異的な CenH3 などがこれまでに研究されている。

ヒストン H2A のバリエーションとしては、H2A.Z, H2AX, H2ABbd や macroH2A が知られている。その中でも H2A.Z は進化的に高度に保存されたヒストンバリエーションであり、多種多様な真核生物に存在し、多様な機能を果たしている。ヒトの H2A.Z と出芽酵母の Htz1 では約 90% 程度の配列が保存されている。また、ヒストン H2A とは 60% 程度の配列相同性がある。H2A.Z は、*Tetrahymena thermophila* (Liu et al ., 1996), *Drosophila melanogaster* (Clarkson et al ., 1999), *Xenopus leavis* (Iouzalet et al ., 1996; Ridgway et al ., 2004) および *Mus musculus* (Faast et al ., 2001) において生存に必須であるのに対し、出芽酵母の Htz1 (酵母 H2A.Z) は必須ではない。

H2A.Z タンパク質は、脊椎動物および出芽酵母において主要なヒストンである H2A の 5~10% の割合で発現されていると考えられ (West and Bonner ., 1980)、遺伝子発現制御、染色体分配、ヘテロクロマチンサイレンシング、細胞周期の進行などの様々な機能に必要であることが報告されている。がん患者において H2A.Z が過剰に発現し、H2A.Z を介した細胞機能の調整の不備ががんの発症と関連するとの報告もなされている。

通常の ヒストン H2A を含むヌクレオソームの構造の解明後、*Xenopus* H2A.Z を含んだヌクレオソームの構造解析が報告されている (Suto et al ., 2000)。両ヌクレオソームの構造は良く似ているが、ヒストン H3-H4 四量体とのドッキングドメイン (H2A の 81-119) において、特にヒストン H2A における Gln 104 が H2A.Z では Gly 106 になっている影響で、3 本の水素結合が無くなり、H2A.Z-H3 相互作用がわずかに不安定になっているという違いがわかっている。またヌクレオソーム表面にある、H2A.Z の His 112 が金属イオンと結合しており、それを His 114 が安定化している。ヒストンは DNA (酸性) と結合する特質から塩基性である。ところが、ヌクレオソーム表面上に酸性アミノ酸の集中した表面 (acidic patch と呼ばれる) が存在し、その領域は ヒストン H2A-H2B 二量体および H2A.Z-H2B 二量体にマップされ

る。両二量体の **acidic patch** 領域のアミノ酸配列は高度に保存されているが、H2A.Z において酸性アミノ酸がひとつ多くなっている。

各コアヒストンは、3 つの α ヘリックス ($\alpha 1 \sim \alpha 3$) とそれらをつなぐループ (L1, L2) から構成される。この構造に加えて H2A は、この構造の N 末、C 末側にそれぞれ αN , αC と呼ばれる構造をもち、H2B は αC のみを、H3 は αN のみをもつ。ヌクレオソーム中における二つのヒストン H2A 間の相互作用はヒストン H2A の L1 ループ同士で行われるが、この相互作用が H2A.Z では異なっている。この L1 loop の違いから、生体内では、ヒストン H2A と H2A.Z を同時に含む雑種のヌクレオソームは存在しえないと考えられる。一方、試験管内で ヒストン H2A-H2B 二量体および H2A.Z-H2B 二量体を同時に含む雑種ヌクレオソームが作製された (Chakravarthy et al ., 2004)。しかし、このような雑種ヌクレオソームが細胞内で存在しうるかの証明はまだない。

第3章

Htz1 と H2A において共通な機能を持つ領域の同定

第1節 Htz1 と H2A において共通な機能を持つ領域のスクリーニング

ヒストン H2A と Htz1 の配列の相同性は約 60%である (Fig. 3)。ヒストン H2A を含んだヌクレオソームおよび H2A.Z を含むヌクレオソームの構造解析がなされ、両者の比較を行うと、配列の相同性から考えられるよりも構造的な類似性が高いと報告されている (Suto et al., 2000)。

```
Sc_H2A 1 -----MSGGKGGKAGSAAKASQSRSAKAGLTFPVGRVHRLLRGNY-AQRI GSGAPVYL
Sc_Htz1 1 MSGKAHGGK GKS GAKD SGSLRSQSSSARAGLQFPVGRI KRYLKRHATGRTRVGSKAAYL

Sc_H2A 54 TAVLEYLA AEI LELAGNAARDNKKTRI PRHLQLAIRNDDEL NKLLGNVTIAQGGVLPNI
Sc_Htz1 61 TAVLEYLTAEVLELAGNAAKDLKVKRI TPRHLQLAIRGDDEL DSLIR-ATIASGGVLPNI

Sc_H2A 114 HQNLLPKKSAKATKASQEL
Sc_Htz1 120 NKALLLKVEKKGSKK----
```

Fig. 3 出芽酵母の H2A と Htz1 の配列比較

約 60%の配列が共通しており、共通な機能が存在することが示唆される

そのため、H2A と Htz1 には共通な機能及びそれぞれに特有の機能が存在することが予測される。しかし、これまでに行われてきた研究はヒストンバリエント Htz1 のコアヒストンとは異なる特殊な機能に着目したものであった (reviewed in Zlatanova et al., 2008 ; Raisner et al., 2006 ; Guillemette et al., 2006)。また、ヒストン H2A と Htz1 はお互いに機能的に相補できない例も報告されている (Jackson et al., 2000)。このように、これまでに両者の共通の機能に着目した研究はなされていない。

ヒストン H2A のアラニン置換ライブラリーそれぞれの示す表現型、*htz1* 欠損株の示す表現型をこれらの二重変異体と比較した時、各単独の変異では観察されない表現型を示すものがあれば、共通の機能があることが示唆される。そこで、ヒストン H2A と Htz1 に共通した機能が存在するか否かを調べる目的で、*htz1* 欠損と H2A 点変異体の二重変異株を系統的に作製し、それら二重変異株の致死性や増殖能の低下を指標としたスクリーニングを行なった。

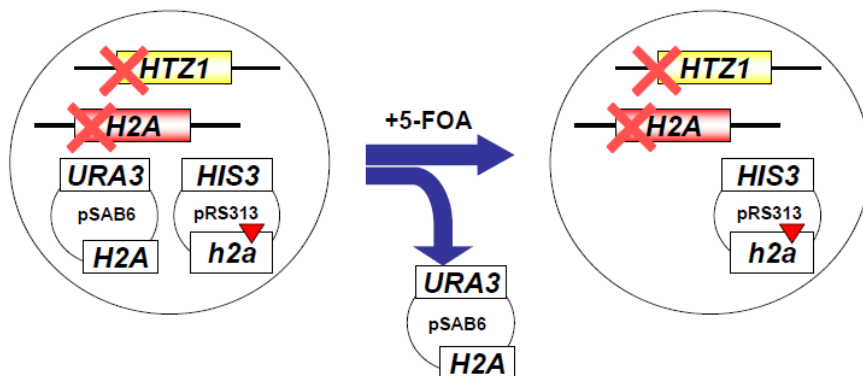
コアヒストン (ヒストン H2A, H2B, H3, H4) は、全て必須遺伝子であるため、ゲノム上のヒストン遺伝子を破壊し、野生型のヒストン遺伝子が挿入された *URA3* マーカーのプラスミドで相補した状態の細胞で、必須遺伝子ではない *HTZ1* 遺伝子を破壊した。この細胞に、野生型または点変異ヒストン遺伝子が挿入された *HIS3* マーカーのプラスミドを導入し、5-FOA (5fluoroorotic acid) を含有する培地上で培養することにより *URA3* マーカーのプラスミドを脱落させ、得られた二重変異体の表現型を調べた (Fig. 4)。 *HIS3* マーカーの empty ベクターを導入した細胞は、5FOA を含む培地上で致死となるコントロールとして用いた。

H2A 点変異体ライブラリー112 種類 (GLASP および GLAMP ライブラリー) について、二重変異体を作製し、致死性検定を行った。評価の基準として、Empty ベクターをもつコントロールと比較して同程度の生育を示すものを致死、野生型ヒストン H2A をもつコントロールと比較して生育が 100 倍以上低下するものを増殖能の低下と判断した。112 種類のうち 10 種類が致死となり 6 種類で増殖能が低下した H2A-58A, -E62A, -D91A は単独で致死であることが報告されているため検定から除外した)。

すなわち、H2A-R30A, -E57A, -E65A, -L66A, -D73A, -E93A, -L94A, -I103A, -I112A及び -L116A変異体がHtz1 の完全欠損時に致死となり、H2A-F26A, -R43A, -G68A, -N69A, R78A, 及び-I79Aは増殖能が低下した (Fig. 5)。ちなみに下線部の変異はヌクレオソーム構造中に埋もれたアミノ酸残基に対応している。

これらのアミノ酸残基は、出芽酵母のヒストン H2A と Htz1 の間で保存されたアミノ酸であり、ヒトのヒストン H2A や H2AZ と比較を行ったときにも保存されたアミノ酸であった (Fig. 3)。このことから、これらのアミノ酸残基は、種を超えてヒストン H2A と H2A バリエントに共通する機能を発揮する際に利用されるアミノ酸残基であることが示唆された (Table. 1)。

a



b

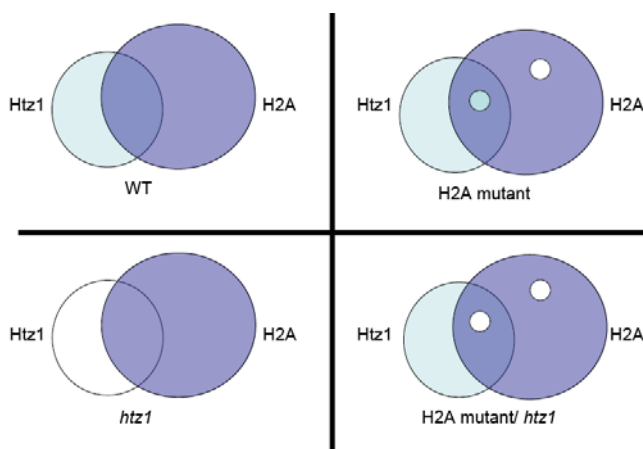


Fig. 4 二重変異体作成方法およびスクリーニングの概要

a) 5-FOA によって、相補されていた野生型プラスミドを失い二重変異体を得る

b) 共通の機能が存在し補い合っているとき (円に重なりがあるとき)、その機能を欠損させるためには両方に変異を導入する必要がある、そのとき初めて表現型が得られる。

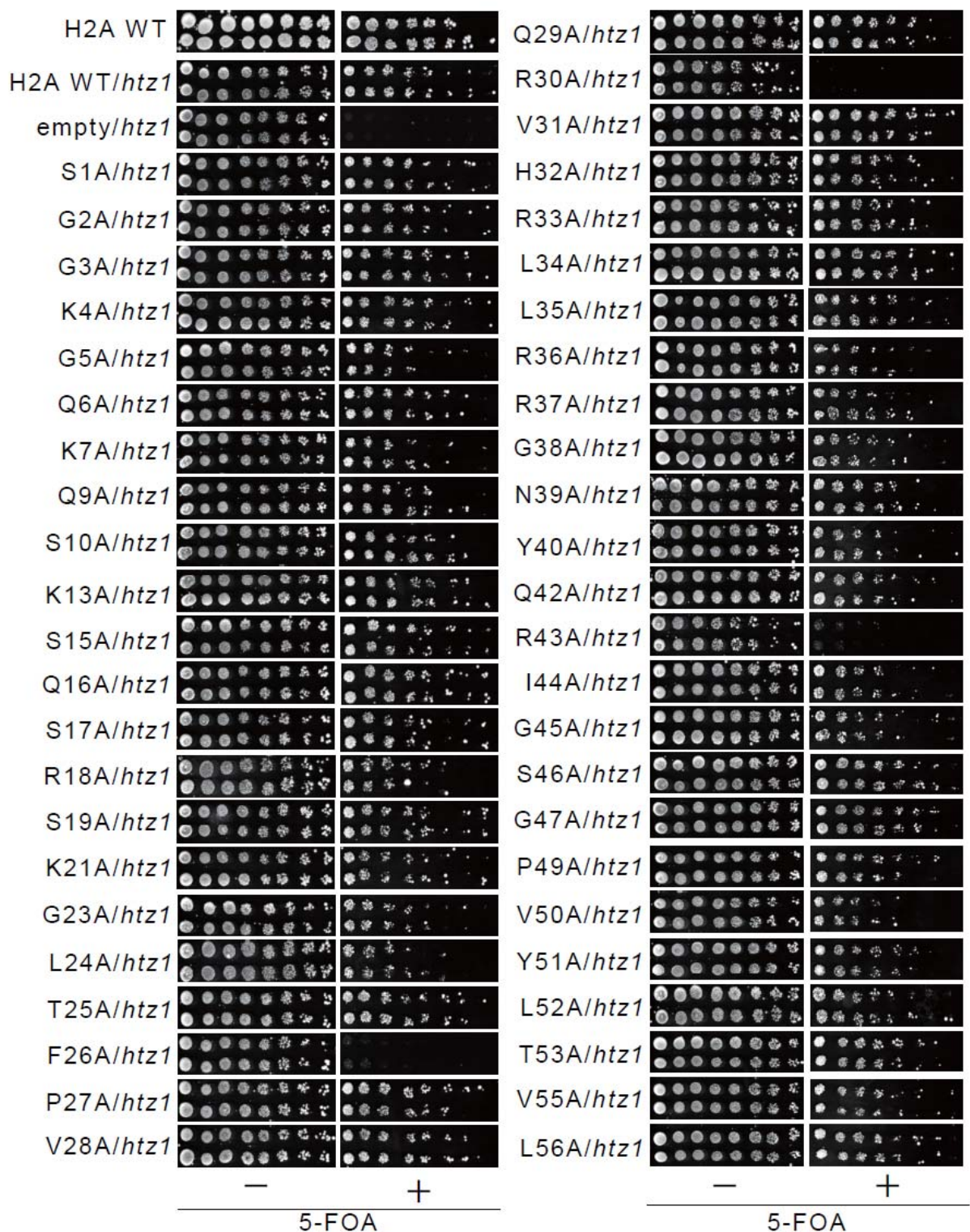


Fig. 5 致死性や増殖能の低下を指標とした *htz1* 欠損と H2A 点変異体の二重変異株の網羅的スクリーニング

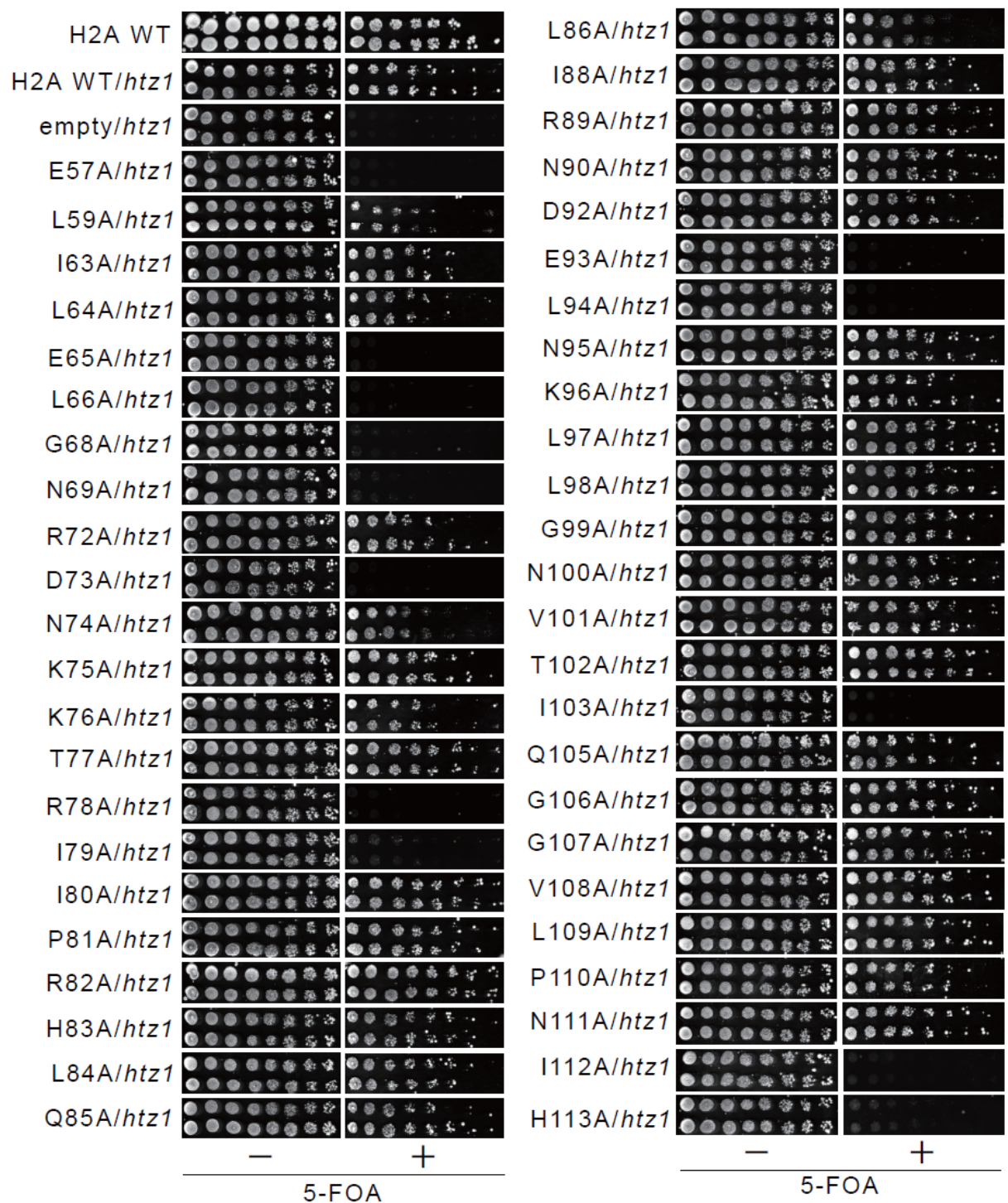


Fig. 5 致死性や増殖能の低下を指標とした *htz1* 欠損と H2A 点変異体の二重変異株の網羅的スクリーニング

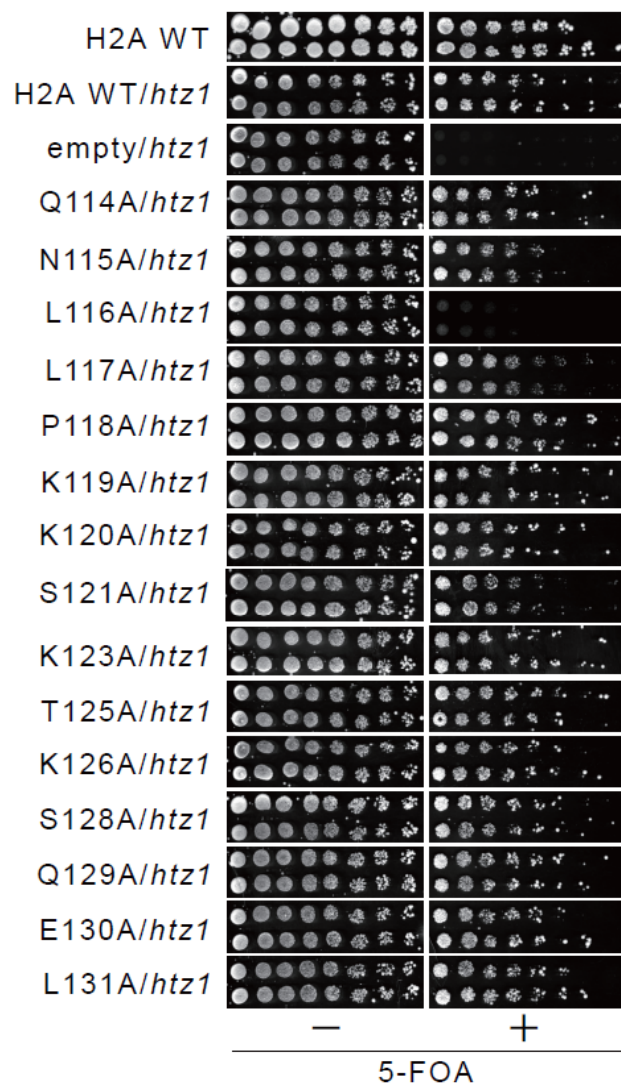
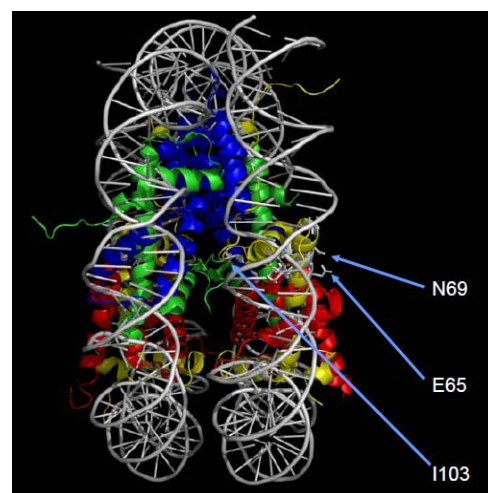
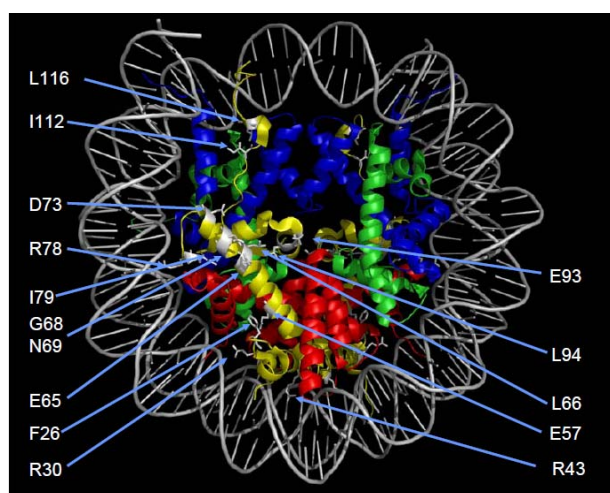


Fig. 5 致死性や増殖能の低下を指標とした *htz1* 欠損と H2A 点変異体の二重変異株の網羅的スクリーニング

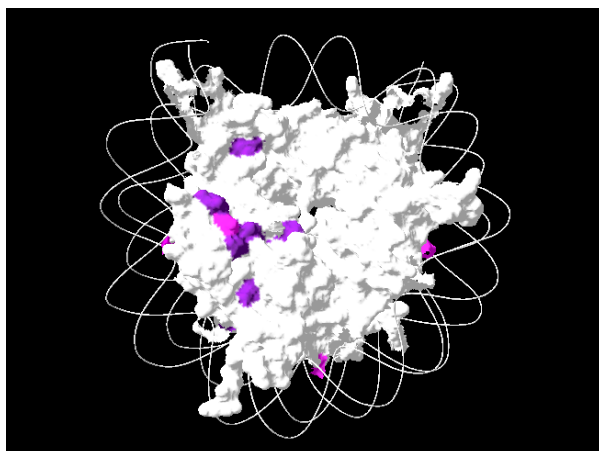
次に、ヌクレオソーム構造上で、どの領域がこのスクリーニングによって見出された機能に関わるかを調べるために、Htz1 の完全欠損株との二重変異で致死となるアミノ酸残基をヌクレオソームの立体構造中にマッピングした。その結果、acidic patch 周辺領域 (H2A-E57, -E65, -L66, -G68, -N69, -D73, -E93, -L94)、ヒストン H2A-DNA 相互作用可能領域 (H2A-R30, -R43, -R78)、ヒストン H2A 内相互作用領域 (H2A-I79)、ヒストン H2A-H2B (H2A -F26) 相互作用領域、ヒストン H2A-H4 相互作用領域 (H2A-I103) 及びヒストン H2A の C 末端のヒストン H3 および H4 への相互作用領域 (H2A-I112, -L116) に存在することがわかった (Fig. 6a-c, Table. 2)。4 Å 以内に存在するアミノ酸残基；ファンデルワールス力が働いたり、水素結合が形成されうる距離。

また、このスクリーニングで得られた機能表面が、GLASP 解析で得られたどの機能表面と関連があるかを調べるために、ベン図を作成し、*htz1* と合成致死になるアミノ酸残基のアラニン点変異体の示す表現型と、Spt 表現型、6AU 感受性、HU 感受性および MMS 感受性の機能表面とを比較した。その結果、*htz1* と合成致死になるものは、転写、複製、修復など様々な機能表面との関連があり、特に MMS、HU 感受性の集合に完全に包含された (Fig. 6c)。

a



b



C

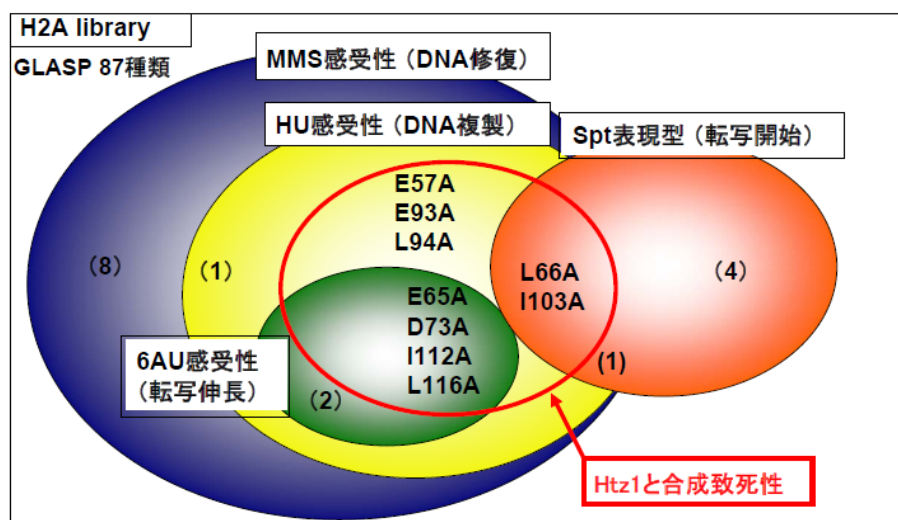


Fig. 6 Htz1 の完全欠損時に致死性や Slow growth 表現型を示す残基の位置および GLASP の機能表面との比較

- a) Htz1 の完全欠損株との二重変異で致死となるアミノ酸残基をヌクレオソームの立体構造中にマッピング。H2A (黄)、H2B (赤)、H3 (青)、H4 (緑)、DNA (灰色) 白で Htz1 の完全欠損時に致死性や Slow growth 表現型を示す残基の位置を示す。
- b)ヌクレオソームの分子表面上で示した。
紫；*HTZ1* の欠損時に致死、ピンク；*HTZ1* の欠損時に slow growth 表現型
- c)GLASP 解析の結果と比較したベン図。赤で示す Htz1 と合成致死の表面は、様々な核内反応に利用される表面であった。図中の数字は、そこに含まれる変異体の数を表している

ヒストン H2A の分子表面の中で、Htz1 欠損時に致死性を示すものは全て HU や MMS 感受性であった。よってヒストン H2A 以外のコアヒストン分子のなかで MMS 感受性を示すものの中にも同じように *HTZ1* 遺伝子の欠損時に致死性や増殖能の低

下を示すものがあるのではないかと考えた。そこで、MMS 感受性を示すヒストン H2B 点変異体の中で *HTZ1* 遺伝子の欠損時に致死性や増殖能の低下を示すものがあるか調べた。その結果、MMS 感受性のヒストン H2B 点変異体ライブラリー11 種類のうち 3 種類 (H2B-E116A, -R119A, -K123A) が致死となり、1 種類 (H2B-H112A) が Slow growth 表現型を示した (Fig. 7)。

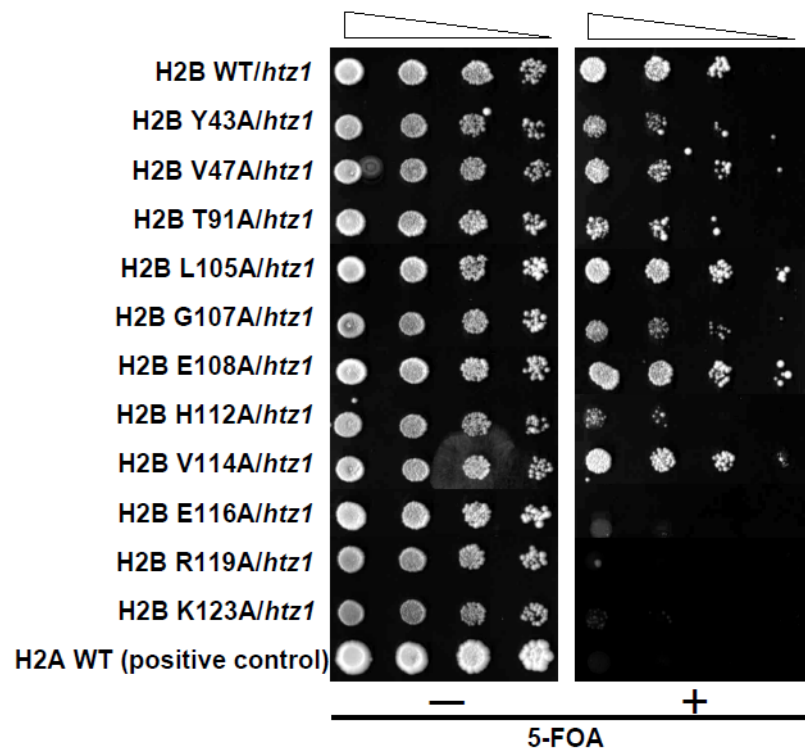


Fig. 7 MMS 感受性の H2B 変異体の中に *Htz1* の完全欠損時に致死性や Slow growth 表現型を示す残基が存在する

H2B-H112A, -E116A, -R119A および-K123A は *HTZ1* の欠損時に致死性や Slow growth 表現型を示す

この結果をヒストン H2A の結果と併せて立体構造上にマッピングした。その結果、acidic patch の周辺領域に多くの残基が集中した (Fig. 8)。ここで同定されたヒストン H2B の残基はヒストン H2B の α C 領域の α ヘリックス上でヘリックスの軸方向に

一列に側鎖を同一の向きにして並んでいる。また、ヒストン H2B-K123 はユビキチン化されることが知られており、H2A-L66A や H2B-H112A 変異体では、ヒストン H2B-K123 のユビキチン化が減少していることが報告されている (Nakanishi et al., 2008)。このことは、acidic patch 領域への変異はヒストン H2B のユビキチン化以外の修飾やリモデリング因子・ヒストンシャペロンの関与する反応などに影響を与えることを示唆する。

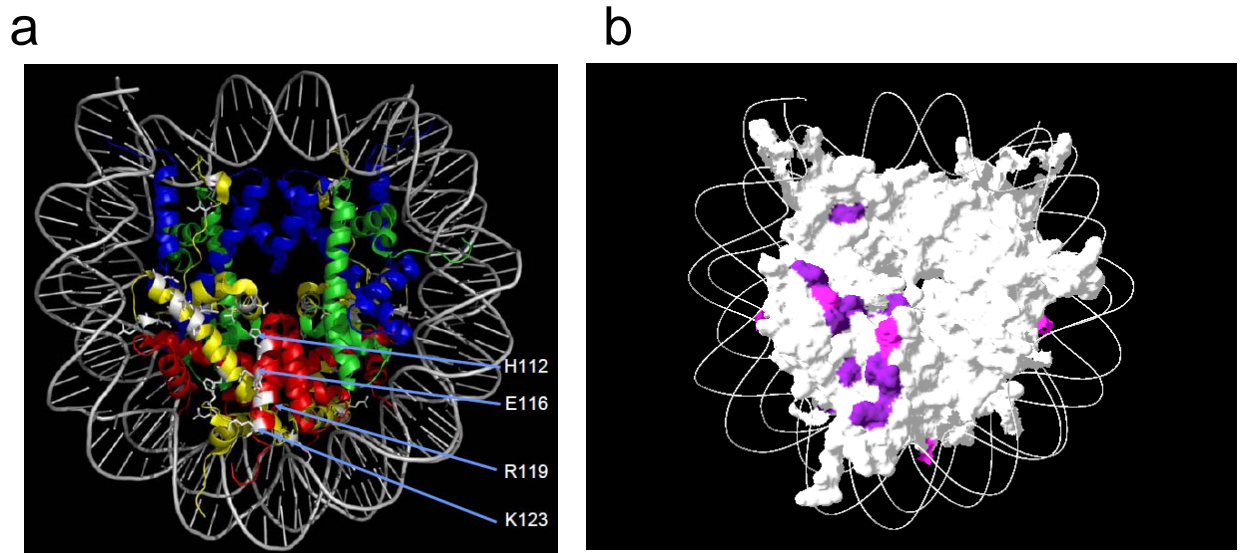


Fig. 8 Htz1 の完全欠損時に致死性や Slow growth 表現型を示す残基のマッピング

- a) Htz1 の完全欠損株との二重変異で致死となるアミノ酸残基 (H2A と H2B の一部) をヌクレオソームの立体構造中にマッピング
- b)ヌクレオソームの分子表面上で示した。acidic patch の周辺領域に多くの残基が集中した紫；HTZ1の欠損時に致死、ピンク；HTZ1の欠損時に slow growth 表現型

| H2A | Htz1 欠損時の表現型 | 保存性 | 単独の表現型 | ヌクレオソーム上の領域 |
|-------|--------------|------------|--------------|--------------|
| F26A | Slow growth | 全て保存 | GLAMP | H2B 相互作用 |
| R30A | 致死 | H2ABbd で Q | GLAMP | DNA |
| R43A | Slow growth | 全て保存 | GLAMP | DNA |
| E57A | 致死 | 全て保存 | HU, MMS | acidic patch |
| E65A | 致死 | 全て保存 | 6AU, HU, MMS | acidic patch |
| L66A | 致死 | 全て保存 | Spt, HU, MMS | acidic patch |
| G68A | Slow growth | 全て保存 | GLAMP | acidic patch |
| N69A | Slow growth | 全て保存 | なし | acidic patch |
| D73A | 致死 | H2ABbd で N | 6AU, HU, MMS | acidic patch |
| R78A | Slow growth | H2ABbd で N | GLAMP | DNA |
| I79A | Slow growth | 全て保存 | GLAMP | H2B 相互作用 |
| E93A | 致死 | H2ABbd で L | HU, MMS | acidic patch |
| L94A | 致死 | 全て保存 | HU, MMS | acidic patch |
| I103A | 致死 | 全て保存 | Spt, HU, MMS | H4 相互作用 |
| I112A | 致死 | H2ABbd でなし | 6AU, HU, MMS | H3 相互作用 |
| L116A | 致死 | H2ABbd でなし | 6AU, HU, MMS | H3 相互作用 |

Table. 1 HTZ1 欠損時に致死性や slow growth 表現型を示す残基のまとめ

保存性;これらのアミノ酸は yeast の H2A と Htz1 で保存されており、ヒトの H2A と H2A.Z でも保存されている。表中にはヒトの 5 種類の H2A とそのバリエーション (H2A.Z, H2AX, H2ABbd, macroH2A) で保存されているかを示した
感受性;各残基のアラニン置換体の示す表現型。GLAMP は未検定
ヌクレオソーム上の領域;ヌクレオソーム上でどの領域に分類されるかを示す

| | DNA | H2A | H2B | H3 | H4 | H2A' | H2B' | H3' | H4' |
|------------|------|-----------------------------------|------------------------------------|----|----|------|------|-----|-----|
| H2A F26 | | T25 P27 E57-hm A60 | Y40-MP Y43-m I44-MP V47-m | | | | | | |
| H2A R30 | 1 塩基 | V31-MP L34-MP | E38 T39 Y43-m | | | | | | |
| H2A R43 | 3 塩基 | Q42 | T91-m | | | | | | |
| H2A E57 | | L24 T25 F26-s Y58-lethal | V47 | | | | | | |
| H2A E65 | | L66 N69 | H52 | | | | | | |
| H2A L66 | | E62 D91 | | | | | | | |
| H2A G68 | | L64 E65 A67 N69 I79 | | | | | | | |
| H2A N69 | | E65 L66 R72 | | | | | | | |

Table. 2 スクレオソーム中で 4 Å 以内に存在する残基とその残基のアラニン変異体の示す表現型
a ; 6-AU sensitive, s : Spt phenotype, h ; HU sensitive, m ; MMS sensitive, MP ; GLAMP (未検定)

| | DNA | H2A | H2B | H3 | H4 | H2A' | H2B' | H3' | H4' |
|----------|------|----------------------------------|------------------|----|----|------|------|-------------------------------------|--------|
| H2A D73 | | N69 | | | | | | | |
| H2A R78 | 2 塩基 | I79 | G56-MP S58-MP | | | | | | |
| H2A I79 | | A67 G68-MP I80 | T55 G56-MP | | | | | | |
| H2A E93 | | D91-lethal D92 | E108-sm | | | | | | |
| H2A L94 | | I63-MP D91-lethal | L109-lethal | | | | | | |
| H2A I103 | | Q85-MP I88-MP T102 A104 | I64-MP | | | | | | Y98-hm |
| H2A I112 | | N111 H113-ahm L117-hm | | | | | | L48-lethal I51-lethal R52-shm | |
| H2A L116 | | H113-ahm N115-m | | | | | | N108 V117 | G42-MP |

Table. 2 スクレオソーム中で 4 Å以内に存在する残基とその残基のアラニン変異体の示す表現型
a ; 6-AU sensitive, s ; Spt phenotype, h ; HU sensitive, m ; MMS sensitive, MP ; GLAMP (未検定)

第 2 節 acidic patch 周辺領域への相互作用因子の推測

HTZ1 遺伝子の欠損時に致死性や増殖能が低下をまねくものは、ヌクレオソーム構造中で、いくつかの領域に集中することが明らかになった。その中でも、acidic patch 周辺の領域は、ヌクレオソーム中で、DNA や周辺のヒストンに埋もれておらず、表面の露出された領域である。よって、この領域が様々な核内反応において多くのクロマチン因子が相互作用する共通の機能表面である可能性が考えられた。さらに、acidic patch 周辺の領域に集中する、*HTZ1* 遺伝子の欠損との二重変異で致死性や増殖能を低下させる残基はヒストン H2A と Htz1 の間で同一であることから両者に共通の機能を発揮する際にこの領域に同一の因子が相互作用することも予測される。

よって、この領域に相互作用する因子がヒストン H2A と Htz1 の両者に共通の機能を担うものであると考えられる。そこで、相互作用因子を探索する目的で、既知の相互作用因子から新規の相互作用因子を推測することを試みた。

ヌクレオソーム結晶構造解析の結果から acidic patch には、近傍のヌクレオソームから伸びたヒストン H4 のテイルが相互作用することが知られている (Luger et al, , 1997)。しかし、ヒストン H4 テイルを切断した出芽酵母が生存可能であることから、acidic patch 領域の機能はヒストン H4 テイルとの結合のみとは考えにくい。また、この領域にカポジ肉腫関連ウイルス (Kaposi' s sarcoma-associated herpes virus ; KSHV) の LANA (latency-associated nuclear antigen) と呼ばれるタンパク質が相互作用することが報告されている (Barbera et al, , 2006)。LANA は、全長 1162 アミノ酸からなり、宿主の染色体との結合に N 末の 22 アミノ酸が必要である (Fig 9a) ことから、LANA (1-22) と似た配列を持つタンパク質を出芽酵母のタンパク質中から検索した。

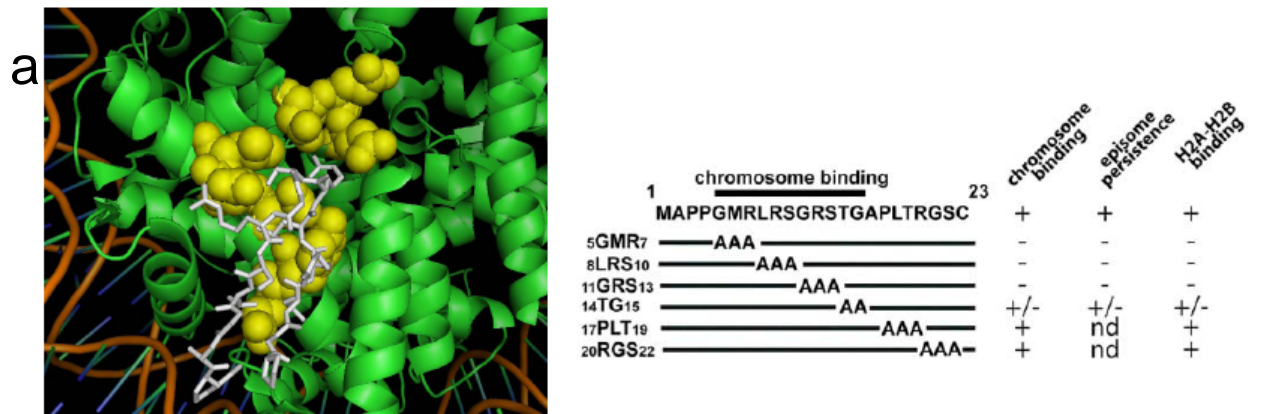
検索結果中で、スコアが高く、クロマチン関連タンパク質であることから、*EAF7* という遺伝子を候補として考えた (Fig 9b)。Eaf7 は NuA4 HAT complex

と呼ばれるヒストン H2A, Htz1 やヒストン H4 のテイルをアセチル化する複合体のサブユニットのひとつであり、これまでに *eaf7* 遺伝子破壊株の表現型として、*HTZ1*, *ARP6* と合成致死になることが報告されている (Krogan NJ et al., 2004)。acidic patch の点変異体も同様に *HTZ1*, *ARP6* と合成致死になる (後述) ことから Eaf7 が新規の相互作用因子である可能性を考えた。

acidic patch の点変異体は薬剤感受性を示すが、この原因のひとつとしてアミノ酸がアラニンに置換されたことにより、クロマチン関連因子との相互作用が弱り、その後のヌクレオソームの構造変換などの反応に影響をもたらすためと考えられる。そこで、弱まった相互作用を補うために、Eaf1 を変異体中で過剰発現し、感受性が相補されるか検討した。

マルチコピーベクターである YEplac195 (2 μ m) に *EAF7* をクローニングし、acidic patch の点変異体 (H2A-E57A, -E65A, -E93A) にこの過剰発現プラスミドを導入し、これらの点変異体を示す感受性を相補できるか調べた。各点変異体につき、3 クローンずつの検討を行った結果、各点変異体の示す温度感受性、薬剤感受性を相補できなかった (Fig 9c)。

感受性が相補されなかったことから、Eaf7 がこの領域に相互作用していない可能性が考えられる。しかし、NuA4 HAT complex のような複数のタンパク質が複合体として機能するとき、そのうちの単一のサブユニットのみが過剰に存在しても、残りのサブユニットの量は変わらないため、機能的に相補できなかったという可能性も考えられる。そのため、Yeast two hybrid 法や精製タンパク質同士での相互作用解析、タグ付きの変異ヒストン H2A を細胞内から抽出して、それに結合できなくなったタンパク質の同定など、他の方法による検討が必要であると考えられる。



b

Chromosome binding

LANA: 2 APPGMRL RSG- RSTGAPL TRGSCRKRN 28
 +P R ++G R P TR S R RN+

EAF7: 397 SPKR KRRKAGSRKNSPPA TRV SSRLRNK 424

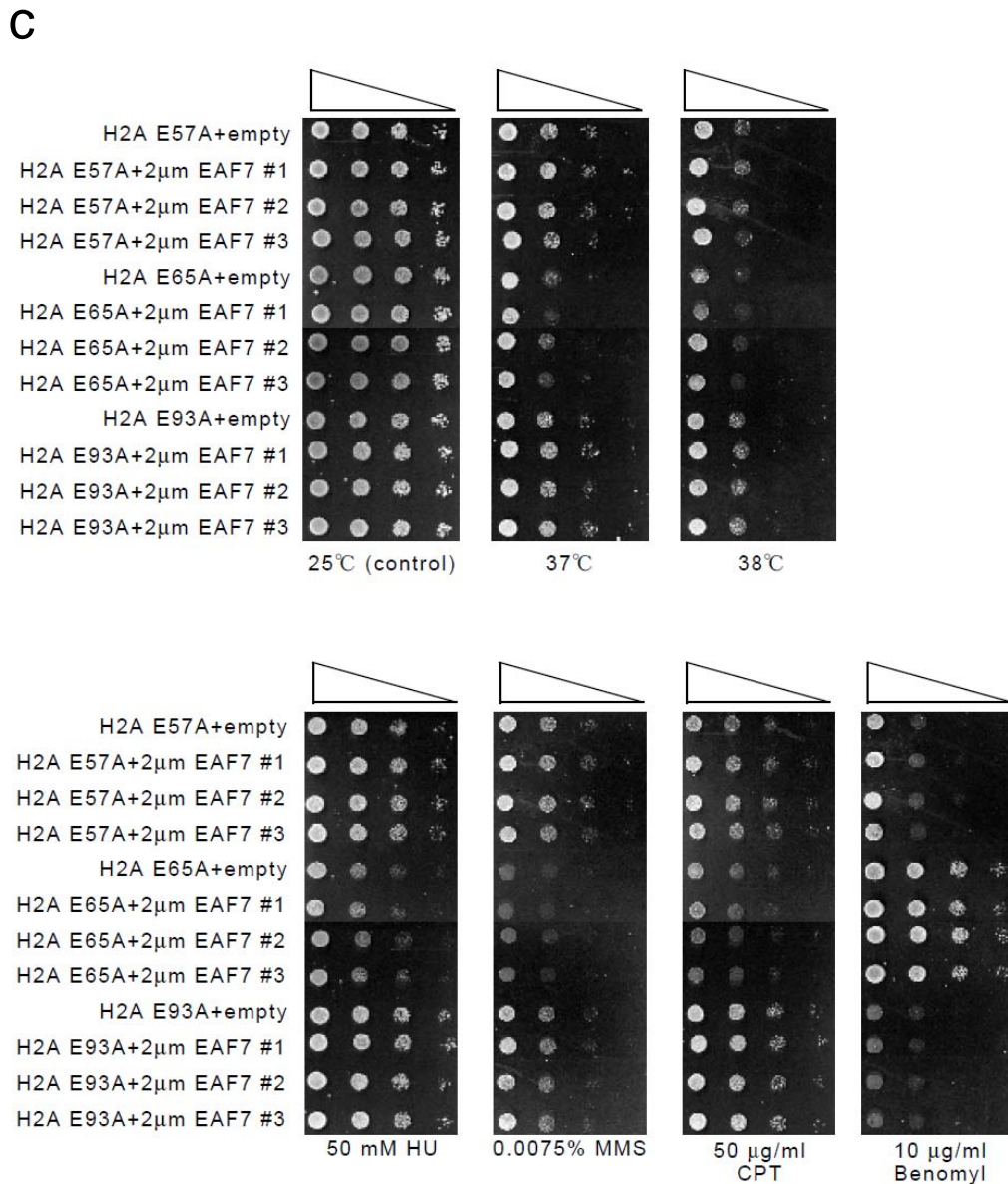


Fig. 9 LANA と似た配列を持つ Eaf7 は acidic patch の変異体の感受性を相補しない

- a) Barbera et al, 2006 より引用。Left) LANA ペプチドが acidic patch 周辺と相互作用する。right) LANA に変異を導入した実験により LANA の染色体結合に必要な配列が決定された。
- b) データベースでの検索結果を示した。acidic patch との相互作用に重要と考えられる塩基性アミノ酸が良く保存されている (赤で示した)。
- c) Eaf7 を acidic patch の変異体に過剰発現させ感受性の相補が見られるか検討した。感受性の相補は観察されなかった。

第 3 節 H2A 点変異体の DNA 修復における機能の解析

ベン図による機能表面の比較 (Fig. 6) から、*htz1* と合成致死になるアミノ酸残基のアラニン点変異体は全て DNA 複製および修復に関与すると考えられる。そこで、これらの点変異体がどのように DNA 修復に関与するかを検討した。今回は、転写の異常による間接的な DNA 修復の欠損の可能性を排除する目的で、転写異常のスクリーニングで陰性であった H2A-E57A, -E93A および -L94A について DNA 傷害チェックポイントの異常、DNA 傷害時のヒストン修飾の異常、DNA 修復機構の異常の可能性について検討した (H2A-R30A 変異体については検討していない)。

はじめに、DNA 傷害チェックポイント機構に欠損を示すかを検討した。細胞には DNA に起こった傷害を検出し、修復されている間は細胞周期を停止させて時間稼ぎをするチェックポイントという仕組みが備わっている。出芽酵母における中心的なチェックポイントキナーゼである Rad53 は、DNA に損傷が起きたときリン酸化されることが知られており、そのシグナルが下流へ伝わり細胞周期を遅延させる。この Rad53 のリン酸化を指標にヒストン点変異体で、DNA 傷害により Rad53 のリン酸化によるバンドシフトが起こるかどうかをウエスタ

ンブロットにより検討した。ここでは、Myc タグのついた Rad53 を検出している。

その結果、検定を行った全ての点変異体で、野生型と同様に DNA アルキル化剤であるメチルメタンスルホン酸 (MMS) 依存的な Rad53 のリン酸化が観察されたことから、これらの点変異体で DNA 傷害チェックポイントが正常に機能していることが示唆された (Fig. 10a)。

次に、DNA 修復に関連したヒストンの修飾のひとつである DNA 傷害依存的な H2A-S128 のリン酸化が起きるかを検討した。DNA 傷害時の H2A-S128 のリン酸化はヒトから単細胞の酵母に至るまで高度に保存されている。ヒトなどの高等動物細胞では、ATM (ataxia-telangiectasia mutated ; Tel1 in *S. cerevisiae*), ATR (ATM and Rad3-related ; Mec1 in *S. cerevisiae*), DNA-PK (DNA dependent protein kinase) によってヒストン H2A バリエーションの H2AX の C 末にある SQE motif のセリンがリン酸化される (γ H2AX)。出芽酵母においては、主要なヒストン H2A の C 末に SQE motif が存在し、phosphatidylinositol 3-kinase family に属する Mec1 や Tel1 によってリン酸化される (γ H2A)。

脊椎動物において、 γ H2AX は DNA に二本鎖切断が起きるとすぐに生成され、傷害部位から両方向にメガベースの単位で修飾されるクロマチン領域が拡がり、修復関連タンパク質の傷害部位での安定した集積を促す。出芽酵母においても、 γ H2A は数十キロベース程度の範囲で拡がることが知られている (reviewed in Downs et al., 2007)。

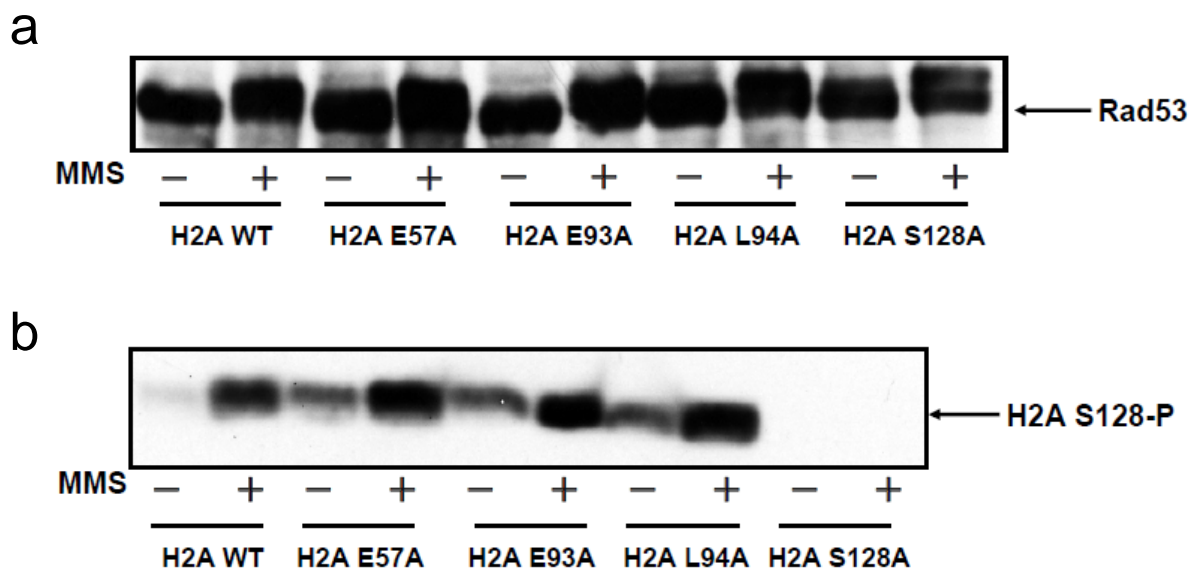
そこで、 γ H2A に対する抗体を用いて、ヒストン点変異体で、DNA 傷害により γ H2A の生成が起こるかどうかをウエスタンブロットにより検討した。その結果、検討を行った全ての点変異体において、野生型と同様に MMS 依存的な H2A-S128 のリン酸化が起きていることから、これらの点変異体はこの修飾

に影響を与えないことが示唆された (Fig. 10b)。

次に、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) によって染色体レベルで DNA 修復が正常に起きているかを観察した。

パルスフィールドゲル電気泳動は、染色体 DNA のバンドをその大きさにより分離でき、コントロールとして用いた対数増殖期の細胞では、C のレーンに示すようなバンドが見られる。その後、MMS で 1 時間処理し (0 のレーン)、スメア状になったバンドが DNA 修復により回復していく様子を野生型と各ヒストン点変異体で比較した。

その結果、野生型では、4 時間後にはコントロールと同程度にバンドが回復しているが、特に H2A-E93A においては、バンドの回復が見られないことから、DNA 修復に遅れが観察され、DNA 修復機構自体に異常があることが示唆された (Fig. 10c)。



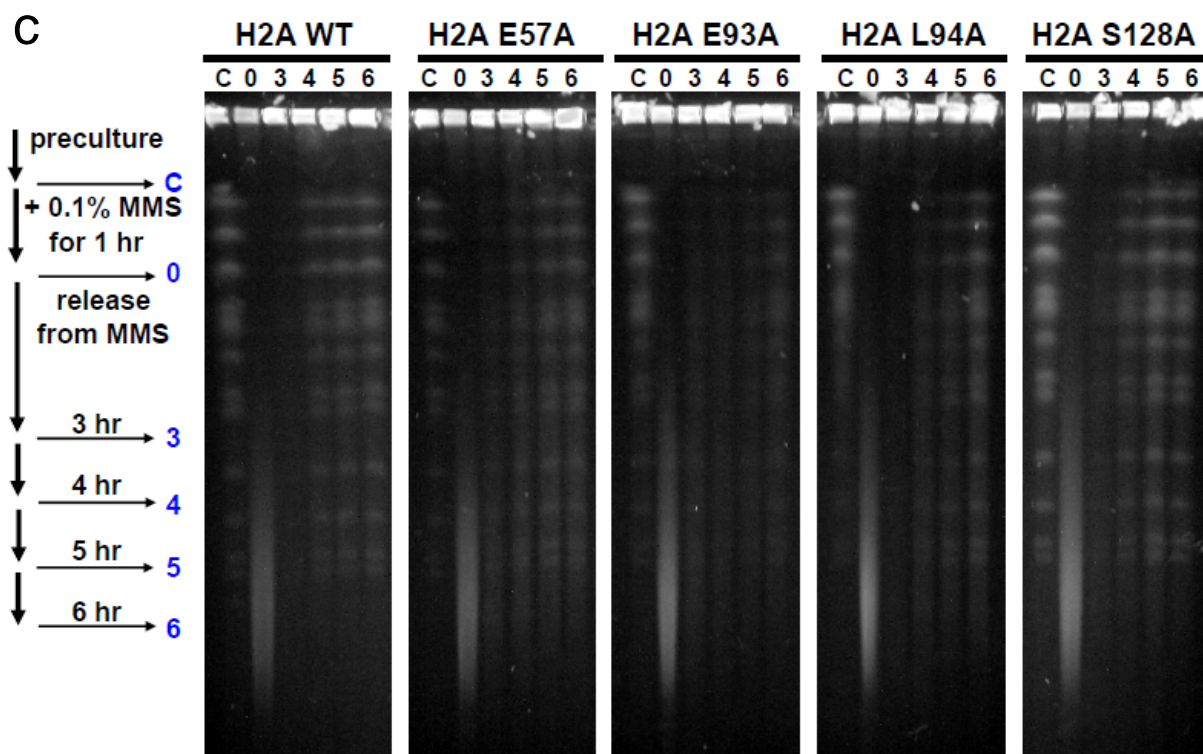


Fig. 9 H2A E93A 変異体は DNA 修復に遅れが観察される

a) H2A, E57A, E93A, L94A および S128A 変異体で DNA 傷害チェックポイントが正常に機能していることが示唆された。

b) H2A, E57A, E93A, および L94A 変異体で DNA 傷害依存的 (MMS を 1 時間処理) な S128 のリン酸化が観察された (S128A では観察されなかった)。

c) H2A, E93A で DNA 修復の遅れが観察された。E57A や L94A でも若干遅れが観察された。S128A 変異体では野生型と同程度であった。

第4章

二重変異体解析による致死性原因の推測

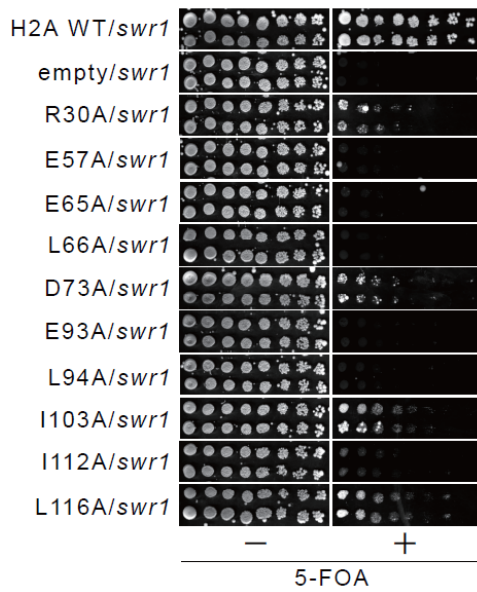
第1節 Swr1 複合体との二重変異体解析

主要なヒストンの発現は、細胞周期を通じて厳密に制御されている。また、ヒストンは DNA 複製と共役して DNA 上に配置される。しかし、ヒストンバリエントは細胞周期を通じて発現され、クロマチン上への組み込みも、S 期中のみならず、S 期以外でも起きることが知られている。

ヒストンバリエントである Htz1 は、SWR1 複合体によってクロマチンに組み込まれる (Krogan et al., 2003; Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004)。クロマチン上に取り込まれていない Htz1-H2B は、細胞抽出液中で Nap1 や Chz1 などのヒストンシャペロンと複合体を形成している (Luk et al., 2007)。つい最近 Chz1 が H2A.Z-H2B 二量体の acidic patch 領域に結合するという構造解析が報告された (Zhou et al., 2008)。そこで、クロマチン上にある Htz1 とそれ以外の Htz1 のどちらがこの機能に重要であるかを推測するために、*htz1* と合成致死になるヒストン H2A 点変異体の *SWR1*, *NAP1* および *CHZ1* 遺伝子をそれぞれ破壊し、二重変異体を作製し、致死性や増殖能の低下の有無を調べた。

その結果、Htz1 は細胞内に存在しているにもかかわらず、*htz1* と合成致死になる H2A 点変異体は、*SWR1* 欠損時にも致死性や増殖能の低下を示した (Fig. 11a)。また、*NAP1* および *CHZ1* 遺伝子を破壊したときには、このようなことは起こらなかった (Fig. 11b)。この結果から、クロマチン上に取り込まれた Htz1 の機能が欠損したことによって、これらの H2A の点変異体は致死性や増殖能の低下を示したものと考えられる。

a



b

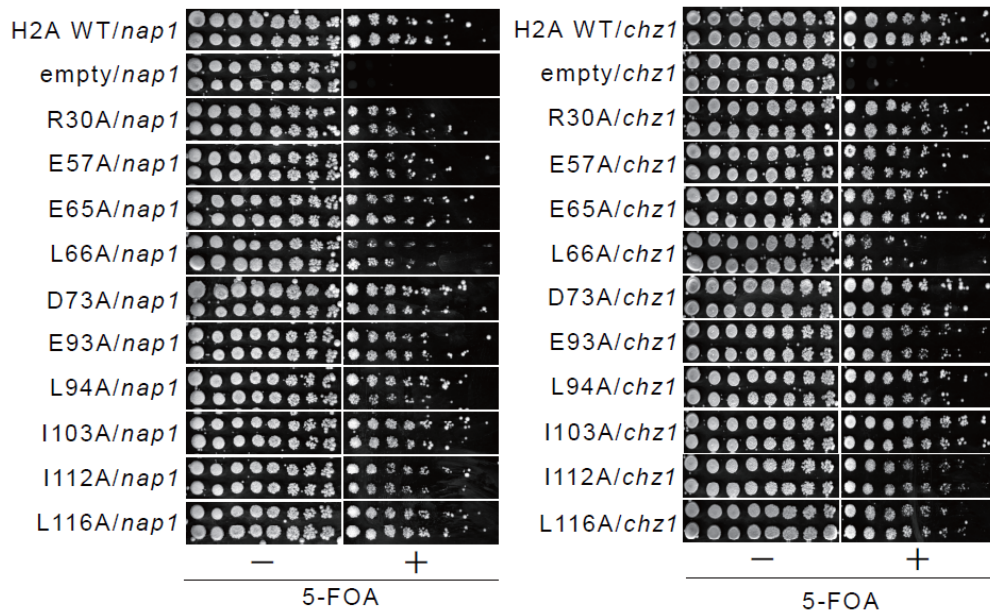


Fig. 11 *htz1* と合成致死になる H2A 点変異体は、*NAP1* および *CHZ1* 遺伝子を破壊したとき致死性や増殖能の低下を示さない (b) が、*SWR1* 欠損時に致死性や増殖能の低下を示す (a)。

クロマチンに Htz1 を組み込むのに必要とされている Swr1 複合体のサブユニットの中で、試験管内で Swc2, Yaf9, Arp6 は Htz1 の交換反応に必要であると報告されている (Wei-Hua Wue et al., 2005)。また、Swc2 は、直接 Htz1 と結合する。

実際、*arp6*, *swc2* 変異体中では完全な SWR1 複合体の形成ができないことも報告されている。そこで、Swc2, Yaf9, Arp6 についても検討を行った。その結果、*htz1* と合成致死になるヒストン H2A 点変異体は、これらの遺伝子欠損時にも致死性や増殖能の低下を示した (Fig. 12)。

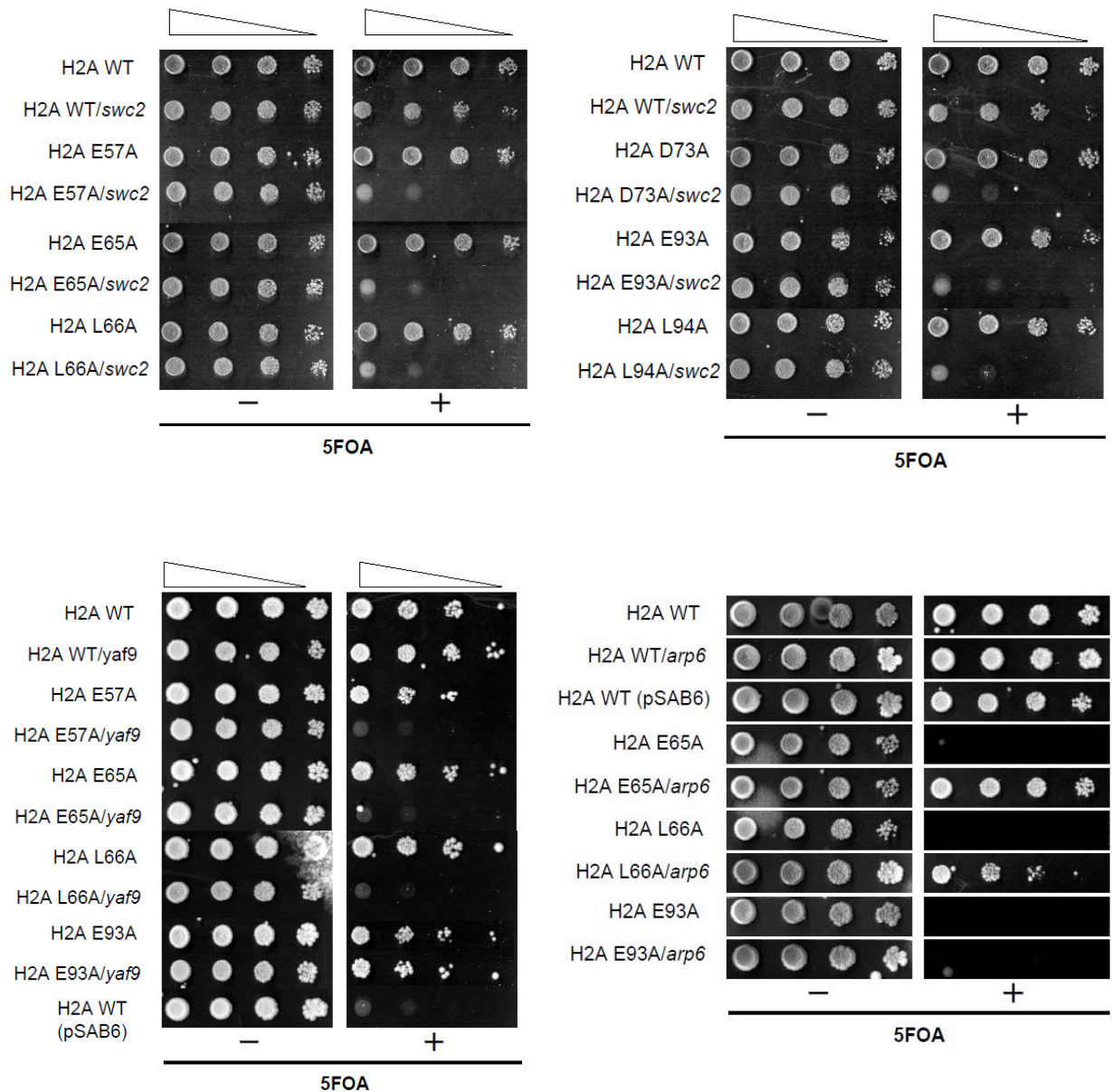


Fig. 12 *htz1* と合成致死になる H2A 点変異体と *SWC2*, *YAF9* および *ARP6* との遺伝学的関連性

htz1 と合成致死になるヒストン H2A 点変異体は、これらの遺伝子欠損時にも致死性や増殖能の低下を示した

第2節 プロモーター領域への Swr1 複合体の集積に必要な因子との 二重変異体解析

ゲノムワイドな Htz1 の結合量解析から、Htz1 は、染色体上でセントロメア、テロメアを含めた様々な染色体の機能領域に存在している。それに加え、特にプロモーター領域（転写の on/off に関わらない）に多く存在していることが明らかとなった (Guillemette et al., 2005; Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005; Li et al., 2005; Millar et al., 2006)。

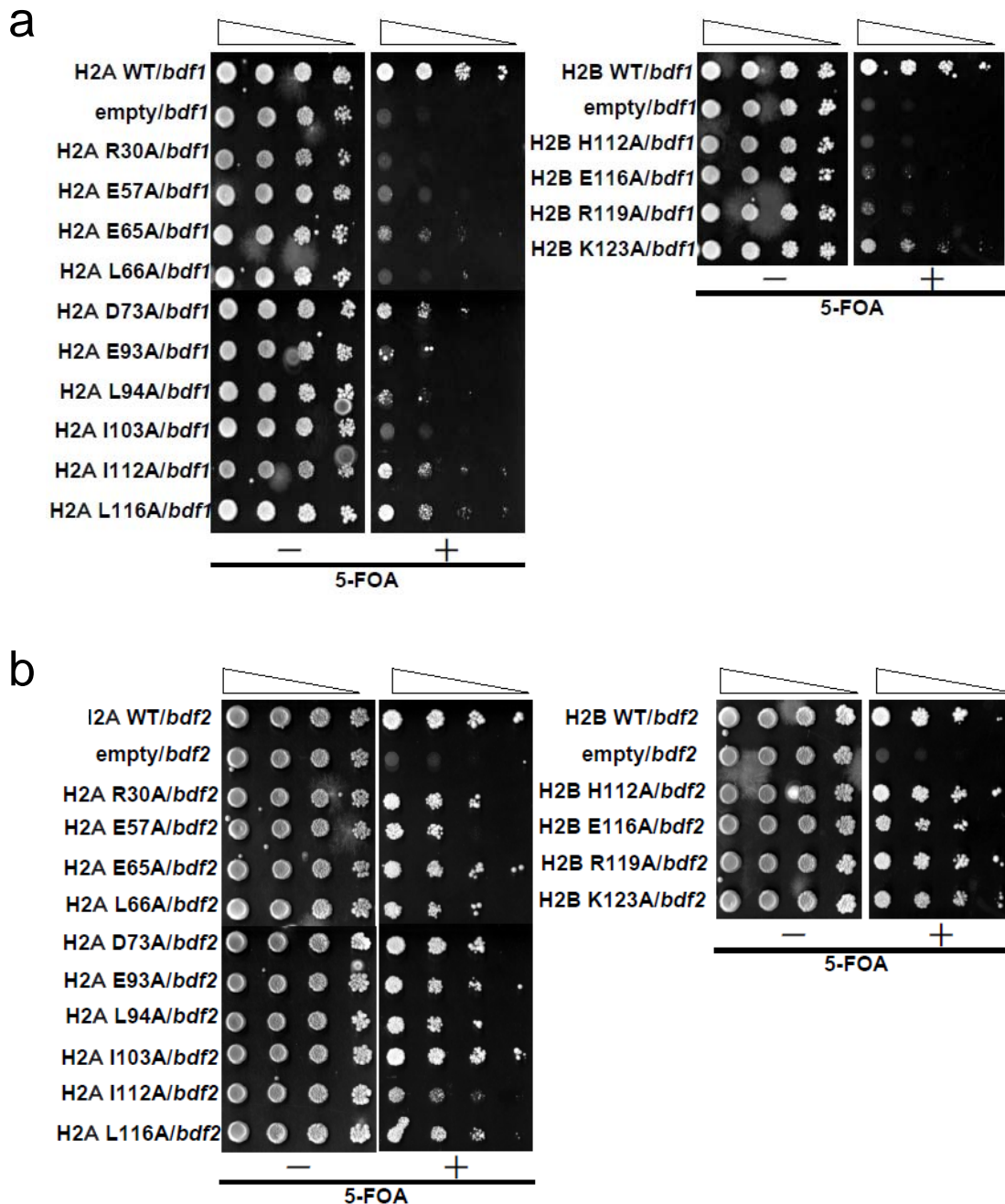
Htz1 は Swr1 複合体によってクロマチン上に組み込まれるが、Swr1 複合体が染色体上のどこにリクルートされるかを決定する際に Swr1 複合体のサブユニットである Bdf1 が重要な役割を果たすと考えられる。Bdf1 はアセチル化されたりジン残基を認識するブロモドメインを持っており、ヒトでは転写制御の要である TFIID の一部になっている。出芽酵母には Bdf1 以外にも SWR1 複合体に含まれないタイプのブロモドメイン含有タンパク質 Bdf2 がある。これまでに *bdf1* 欠損株ではプロモーターへの Htz1 の取り込みが低下するが、*bdf2* 株ではそれに比べてわずかな低下しか起こらないと報告されている (Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005)。そこで、*htz1* と合成致死になる ヒストン H2A 変異体について *bdf1* あるいは *bdf2* との二重変異体を作製し、それらの致死性の検定を行なった。

さらにヒストン H4 の N 末テイルのアセチル化もプロモーターへの Htz1 の取り込みを促進することが知られ、そのアセチル化は主に NuA4 HAT 複合体に触媒される。そこで *htz1* と合成致死になるヒストン H2A 変異体について *eafl* (NuA4 のサブユニットであり、欠損により H4 テイルのアセチル化が検出限界以下になる (Krogan NJ et al., 2004)) との二重変異体を作製し、致死性の検定を行なった。

ヒストン H2A 点変異体ライブラリー10 種類とヒストン H2B 点変異体 4 種類について、二重変異体を作製し致死性検定を行った。*bdf1* については、ヒストン H2A の

10 種類の変異体のうち D73A、I112A、L116A 以外の変異体が致死または増殖能の低下をまねいた。また、ヒストン H2B 変異体の 4 種類のうち K123A 以外の変異体が致死または増殖が遅くなった。 *eaf1* との二重変異の場合ヒストン H2A 変異体 10 種類のうち I103A 以外の変異体が致死または増殖能が低下した (Fig. 12)。

Bdf1 や Eaf1 との二重変異により致死性や増殖能の低下が観察されることから、プロモーター領域への Swr1 複合体による Htz1 の局所的なターゲティングの欠損が、*htz1-H2A* 二重変異株の致死性に関連する可能性が示唆された。



C

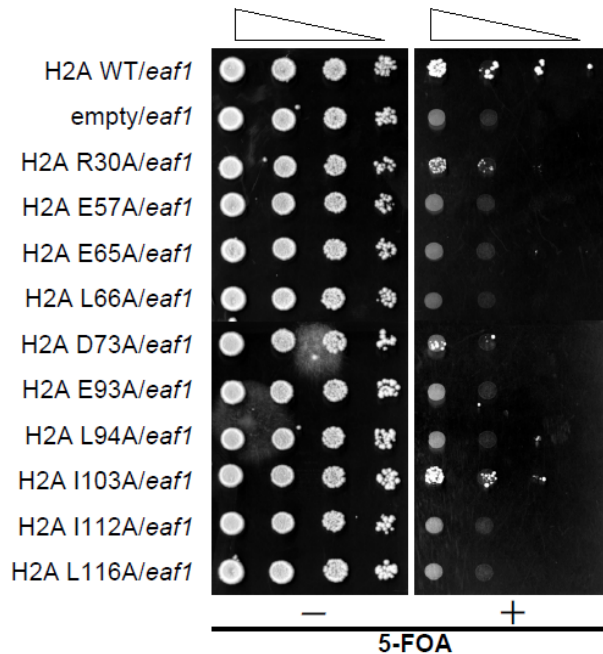


Fig. 12 Htz1 欠損時に致死となる H2A 変異体は生存に Bdf1 や Eaf1 (NuA4 complex) を必要とする

a) b) *HTZ1* 欠損時に致死や slow growth となる H2A, H2B の変異体は Bdf1 の欠損時に致死や slow growth となるが Bdf2 欠損時にはほとんど影響がみられない。

c) *HTZ1* 欠損時に致死や slow growth となる H2A, H2B の変異体は Eaf11 の欠損時に致死や slow growth となる。

第3節 Ino80 複合体との二重変異体解析

Ino80 複合体は、NuA4 HAT 複合体や Swr1 複合体といくつかのサブユニットを共通に持っている。そのため、Ino80 複合体も今回同定された機能表面と関連があることが予測された。そこで、Htz1 欠損時に致死性を示すヒストン H2A の表面がこれらの複合体とも関連があるかを検討した。Arp8 は、Ino80 complex にのみ含まれる

サブユニットであり、*ARP8*を破壊することで Ino80 complex のリモデリング活性が失われることが知られている (Shen X et al.. 2003)。そこで、*arp8*破壊株を作製し、Htz1 の欠損時に致死となるか調べることにした。ヒストン H2A 点変異体ライブラリー10 種類とヒストン H2B 点変異体4 種類について、*arp8* との二重変異体を作製し致死性検定を行った。その結果、ヒストン H2A 変異体の 10 種類のうち E65A、I103A 以外の変異体が致死または増殖能が低下した (Fig. 13)。

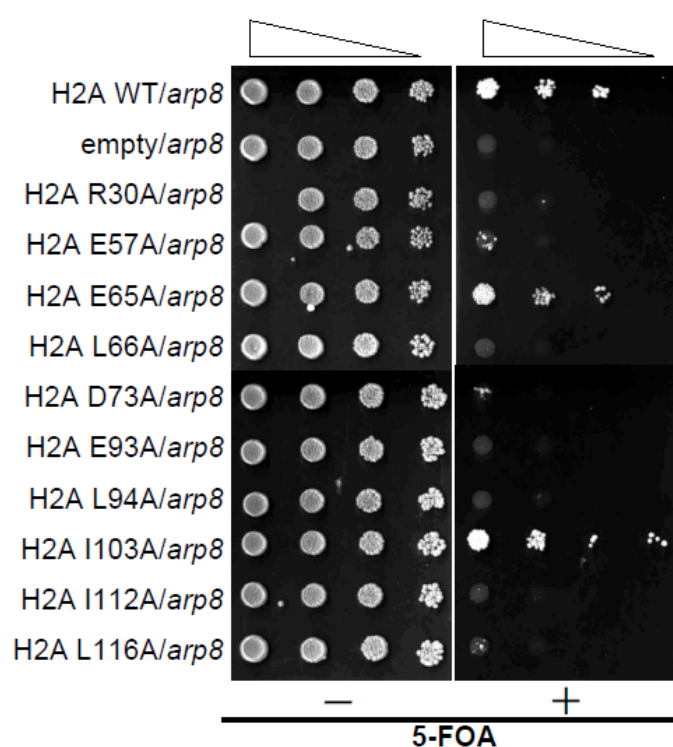


Fig. 13 Htz1 欠損時に致死となる H2A 変異体は生存に INO80 complex を必要とする

H2A E65A, I103A を除く全ての変異体で Arp8 の欠損時に致死または slow growth となった。

第5章 総括

本研究で得られた結果から、H2A と Htz1 にはこれまで知られていなかった共通の機能が存在することが示唆された。さらに、ヒストン H2A, Htz1 の分子表面上で、その機能を発揮するのに利用されるであろう領域を同定した。そして、その機能は、プロモーター領域への SWR1 複合体による Htz1 の局所的なターゲティングに関連する可能性が示唆された。

主要なヒストンとヒストンバリエーションとの関係

まず初めに、共通な機能が存在するか、またそれはどの領域を介して行われるかを明らかにするために、H2A に対する単独の変異では観察されなかった、または単独の変異では弱かった表現型が、必須ではない *HTZ1* 遺伝子と二重変異にしたときに観察されるような H2A のアラニン置換体をスクリーニングにより同定することを試みた。その結果、このスクリーニングによって、112 種類存在した H2A アラニン置換体ライブラリーから 16 種類（致死となる 10 種類と slow growth 表現型を示す 6 種類）が同定された。H2A と Htz1 の配列相同性は約 60%程度であるが、これら 16 種類の残基は、全て共通な配列に含まれていた。さらに様々な生物種の H2A.Z の配列を比較したとき、検討した全ての生物種の H2A.Z においてこれらの残基が保存されており、進化を通じて H2A と H2A.Z の共通な機能を担う領域であると推測される (Fig. 15a)。さらに、出芽酵母では H2A バリエーションは Htz1 のみしか存在しないが、ヒトのような高等真核生物では 4 種類の H2A バリエーションが知られており、ヒトの H2A バリエーションにおいて、今回同定された残基が保存されているか検討すると、H2A Bbd を除く全てのバリエーションに共通するアミノ酸であった (Fig. 15b)。このことは、H2A と H2A バリエーションを含むヌクレオソームが存在したとき、その違いを区別せず同一なものとみなして働きかける因子が存在し、その因子が認識するドメインがこれ

らのアミノ酸によって作られることを示していると考えられる。

a

```

Sc_H2A      1  -----MSGGKGGKAGSAAKASQSRSAAGLTFPVGRVHRLLR-
Hs_H2AZ     1  -----MAGGKAGKDSGKAKTKAVSRSSRAGLQFPVGRVHRELKLS
Dm_H2AvD    1  -----MAGGKAGKDSGKAKAKAVSRSSRAGLQFPVGRVHRELKLS
Ce_Htz-1    1  -----MAGGKAGKAGKDSGKSKVSRSSRAGLQFPVGRVHRELKQ
At_HTA11    1  MAGKGGKGLVAAKTMAANKDKDKKKKPSRSARAGLQFPVGRVHRLKLT
Sc_Htz1     1  -----MSGKAHGGKAGKAGKDSRSRSQSSSRAGLQFPVGRVHRLKR

Sc_H2A      38  RGNYACRIGSGAEVYLTAIEYLAEIIELAGNAARDNKKIRIIPRHLQL
Hs_H2AZ     40  RTTSHGRVGATAAVYSAAIIEYLTAEVIELAGNASKDLKVKIRITPRHLQL
Dm_H2AvD    40  RTTSHGRVGATAAVYSAAIIEYLTAEVIELAGNASKDLKVKIRITPRHLQL
Ce_Htz-1    42  RTTSHGRVGATAAVYSAAIIEYLTAEVIELAGNASKDLKVKIRITPRHLQL
At_HTA11    51  RVSAHGRVGATAAVYTAIIEYLTAEVIELAGNASKDLKVKIRITPRHLQL
Sc_Htz1     45  HATGRTRVGSKAATYLTAVIEYLTAEVIELAGNAKDLKVKIRITPRHLQL

Sc_H2A      88  AIRNDIELNKLIGNVPIAGGGVLEPIHQLLPKKSAAKAKASQEL-----
Hs_H2AZ     90  AIRGDELDLILK-ATIAAGGVIPHIHKSLIGKKGQQKTIV-----
Dm_H2AvD    90  AIRGDELDLILK-ATIAAGGVIPHIHKSLIGKKEETVQDPQKGNVILS
Ce_Htz-1    92  AIRGDELDLILK-ATIAAGGVIPHIHKSLINKKAPVPKPGAPGQGPQ
At_HTA11    101 AIRGDELDLILK-CTIAAGGVIPHIHKSLINKTTKE-----
Sc_Htz1     95  AIRGDELDLILK-ATIAAGGVIPHIHKSLINKLVEKKGSKK-----

```

b

```

Hs_H2A      1  ----MSGRGKGGKARAKATRSRAGLQFPVGRVHRLLR-KGNYSERVG
Hs_H2AZ     1  --MAGGKAGKDSGKAKTKAVSRSSRAGLQFPVGRVHRELKSRITTSRGRVG
Hs_H2AX     1  ----MSGRGKTGGKARAKATRSRAGLQFPVGRVHRLLR-KGHYAHRVG
Hs_H2ABBD   1  MPRRRRRRGSSGAGGRGRGSRIVRAELSEIVSQVERSLR-EGHYACRIS
Hs_macroH2A 1  -----MSGRSKKKMSKLSRSARAGVTFPVGRVHRLLR-KGTEKYRIS

Hs_H2A      46  AGAPVYLAAVIEYLTAIEIELAGNAARDNKKIRIIPRHLQLAIRNDEELN
Hs_H2AZ     49  AATAAVYSAAIIEYLTAEVIELAGNASKDLKVKIRITPRHLQLAIRNDEELN
Hs_H2AX     46  AGAPVYLAAVIEYLTAIEIELAGNAARDNKKIRIIPRHLQLAIRNDEELN
Hs_H2ABBD   50  RTAPVYLAAVIEYLTAIEIELAGNAARDNKKIRIIPRHLQLAIRNDEELN
Hs_macroH2A 43  VGAPVYMAAVIEYLTAIEIELAGNAARDNKKIRIIPRHLQLAIRNDEELN

Hs_H2A      96  KLLGRVTIAQGGVLEPIHQLLPKKTESHKAKGK-----
Hs_H2AZ     99  SLIK-ATIAAGGVIPHIHKSLIGKKGQQKTIV-----
Hs_H2AX     96  KLLGGVTIAQGGVLEPIHQLLPKKTSAIVGPKAPSGGKKATQASQEY--
Hs_H2ABBD   100 TLFNTTITIQVAPGED-----
Hs_macroH2A 93  QLLKGVITIAQGGVLEPIHQLLPKKTAKKRGTKGKSETILSPPEKGRKATSG

```

Fig. 15 H2A や H2A バリエントの配列比較

- 出芽酵母の H2A, Htz1 と様々な生物種の H2A, Z の配列比較
赤で囲った配列が今回のスクリーニングで同定されたアミノ酸残基
様々な生物種で保存されている
- ヒト H2A と H2A バリエントの配列比較
H2A Bbd を除くバリエントでは完全に保存されている

つまり、主要なヒストンとヒストンバリエントとの関係においては、共通な機能と、バリエント特有の機能があるという一般的な原則が存在することが示唆され、ヒスト

ンバリエントが特殊なヌクレオソーム・クロマチン環境を付与する機能だけでなく、様々な核内反応において、お互いに相補的に機能している可能性を示唆している。Htz1 欠損時に致死性や増殖能の低下を示すアミノ酸残基がヒトのヒストン H2A バリエントにおいて H2A Bbd においてのみ一部保存されていない例 (Table1) に見られるように、バリエントに共通な機能を失っているものが遺伝子ファミリーの中に存在することで、生体反応に更なる多様性を生むことも出来る。

事実、H2A Bbd は、acidic patch が変化していることにより、高次のクロマチン構造に影響を与えることが示されており、その作用は H2A.Z とは対照的である (Zhou et al., 2007)。

HTZ1 欠損時に致死や増殖能低下をもたらす機能表面

今回のスクリーニングによって得られた機能表面は、DNA との相互作用部位、ヒストンサブユニット H2B, H3, H4 との相互作用部位、acidic patch 周辺領域に分類された。それぞれの部位がアラニン置換によって致死になる原因を推測すると、DNA や他のヒストンとの相互作用部位の変異体では、ヒストン H2A と Htz1 の両方に変異が入ったとき、ヒストン H2A と Htz1 の交換反応や、H2A と H2A の交換反応もスムーズに起こらなくなることが予想される。また、ヌクレオソームの破壊と再生過程に支障をきたし細胞が生きていくために必要な最低限の機能を喪失してしまうと考えられる。

一方、acidic patch 周辺の領域は、スクリーニングによって多くの残基が集中した (Fig 16 left)。この領域は多くのクロマチン因子との相互作用に共有されている可能性が高く、本領域に変異が入ると複数のクロマチン因子との相互作用に同時に影響を及ぼすため致死になるのではと考えられる。またヒストン H2B 変異体の結果も併せるとこの領域により多くの集中が見られたことから、この表面がクロマチン因子との相互作用に利用される可能性は高いと考えられる (Fig 16 middle)。

GLASP 解析の結果で、acidic patch の周辺にはヒストン H2A に対する単独の変異によって致死となる残基が 3 残基あることが報告された (H2A-Y58A, -E62A および H2B-L109A)。この 3 残基を今回のスクリーニングによって得られた機能表面と重ね合わせると一繋がり表面が形成される (Fig 16 right)。実際にこの致死残基が今回同定された機能表面に分類されるか検討すると、H2A Y58F (viable)は、*HTZ1* 欠損時に致死となったことから、これらの致死残基もこの機能表面に加えることが出来ると考えられる。

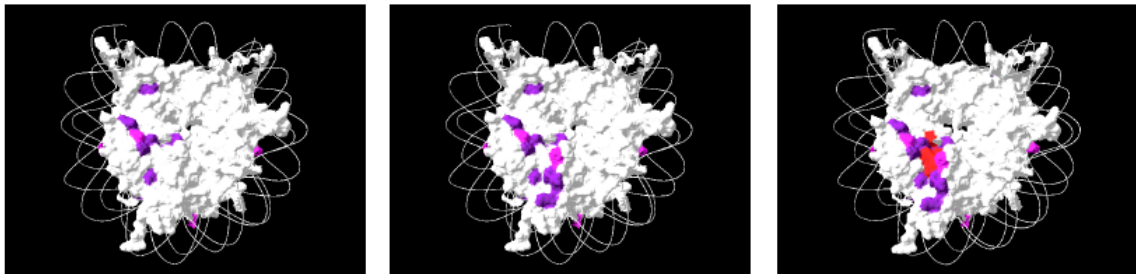


Fig. 16 *HTZ1* 欠損時に致死や slow growth となる機能残基

acidic patchに相互作用する因子は何か？

ヒストン H2A の acidic patch に相互作用することが知られるものとしては、近傍のヌクレオソームから伸びたヒストン H4 テイル (Luger et al 1997)、ウイルスの LANA タンパク質 (Barbera et al, , 2006)がある。また、acidic patch へのアラニン置換によりヒストン H3 K4 のメチル化やヒストン H2B K123 のユビキチン化が検出されなくなることから、これらの修飾を担う酵素が相互作用する領域である可能性も高い (Nakanishi et al., 2008)。さらに Htz1-H2B を含むヌクレオソーム中の acidic patch にはヒストンシャペロンの Chz1 (Zhou et al.,2008) が結合する。このように既知のものだけでもヒストンシャペロンやヒストン修飾酵素複合体などの多様なクロマチン因子がこの領域に相互作用して機能していることがわかり、その他のクロマチン因子の中にもこの領域に相互作用する未知の因子が多数存在すると予測され

る。

予測される相互作用因子が備えているであろう条件としては、アスパラギン酸やグルタミン酸などにより酸性であるというこの表面の特性とリジンやアルギニンに富み塩基性であるヒストンの性質から、①分子内に塩基性に富む部分と酸性に富む部分という二極性を持つ分子。さらに、acidic patch 周辺領域のアミノ酸の保存度は進化を通じて非常に高いことから、②相互作用する相手側の表面も高度に保存された塩基性・酸性・疎水性などのこの領域の相互作用に重要と思われる性質を有していること。実際に、NMR による構造解析から明らかになった、Chz1 の中でこの領域に相互作用する CHZ motif (Luk et al 2007) と呼ばれる領域は、以上の二点を満たしている (Zhou et al, 2008)。

また本研究による二重変異体解析による遺伝学的なアプローチで、acidic patch 周辺のアミノ酸は、SWR1 複合体, NuA4 複合体や INO80 複合体とも関連があることが示唆された。LANA の配列を用いた、相互作用因子の探索により見つかった Eaf7 は NuA4 複合体のサブユニットであることから、NuA4 複合体は、直接この領域と相互作用する可能性が考えられる。それが事実であれば、ヒストン H2A と Htz1 に共通する acidic patch 周辺領域を介して、NuA4 複合体によるアセチル化が制御されている可能性がある。

今回同定された、HTZ1 欠損時に致死性や増殖能の低下を示す変異体は、bdf1 が破壊された状態、つまりプロモーターに Htz1 が組み込まれにくい状況下で致死性や増殖能の低下を示す (Fig. 13)。つまり、プロモーターに組み込まれた Htz1 による機能が欠損したことによる表現型であると考えられる。Htz1 はもともとプロモーターに多く存在している。また、NuA4 複合体との遺伝学的な関連性や acidic patch へのアラニン置換によりヒストン H3 K4 のメチル化や H2B K123 のユビキチン化が検出されなくなることから、今回同定された表面はヒストンの化学修飾を制御する可能性が高い。ヒストン化学修飾がプロモーター周辺で転写を制御している研究が多くなされ

ている。その際、acidic patch 領域周辺がその制御の中心である可能性が高い。この領域はヌクレオソーム構造中で完全に露出している部分であり、特にヌクレオソーム構造の維持に必要とは思われない。ところがこの領域は種を通じて保存され、なおかつ本研究により一連の致死性（ヒストン H2A 単独変異での致死および Htz1 欠損時での致死を含む；Fig. 16）が示されたことから、ヌクレオソーム構造変換の制御で中心の役割を担っていることが示唆された。

第 6 章 実験方法及び材料

第1節 出芽酵母

用いた酵母株を以下に示す

| Strain | Genotype | Source |
|-------------------------|--|------------|
| YK402 | MATa ade2-1 can1-100 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 RAD5 bar1::hisG | Y.Kawasaki |
| YK402 pSAB6 | YK402 HTA1HTB1::HPHMX4 HTA2HTB2::CgTRP1 pSAB6[HTA1HTB1 WT] | This study |
| YK402 <i>htz1</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>htz1</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>swr1</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>swr1</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>nap1</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>nap1</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>chz1</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>chz1</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>swc2</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>swc2</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>yaf9</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>yaf9</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>arp6</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>arp6</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>bdf1</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>bdf1</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>bdf2</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>bdf2</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>eaf1</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>eaf1</i> ::KANMX6 | This study |
| YK402 <i>arp8</i> pSAB6 | YK402 pSAB6 <i>arp8</i> ::KANMX6 | This study |

第2節 培地

2-1 酵母

酵母細胞は、YPAD (完全培地) 及び SC (合成完全培地) を用いて培養した。

2-1-1 YPAD 培地

YPAD 培地は、Yeast extract (Difco) 1%、Bacto peptone (Difco) 2%、Adenine sulfate (Wako) 0.004%、D-glucose (Wako) 2%の割合で精製水に溶解後、プレートとして用いる場合は、Bacto-agar (Difco) 2%を加えて高圧蒸気滅菌 (121℃、20 分) したものを用いた。

2-1-2 SC-His, Ura 培地

Yeast nitrogen base without amino acid (Difco) 0.67%、D-glucose (Wako) 2%、10 × dropout solution (Table2) 10%、L-tryptophane (Wako) 0.004%、L-leucine (Wako) 0.006%の割合で精製水に溶解後、プレートとして用いる場合は、Bacto-agar (Difco) 2%を加えて高圧蒸気滅菌 (121℃、20 分) したものを用いた。

2-1-3 SC-Ura 培地

Yeast nitrogen base without amino acid (Difco) 0.67%、D-glucose (Wako) 2%、Casamino acids (Difco) 0.5%、uracil (Wako) 0.002%、

L-tryptophane (Wako) 0.004%の割合で精製水に溶解後、プレートとして用いる場合は、Bacto-agar (Difco) 2%を加えて高圧蒸気滅菌（121℃、20分）したものを用いた。

2-1-4 SC+FOA 培地

Yeast nitrogen base without amino acid(Difco)0.67%、D-glucose (Wako) 2%、Casamino acids (Difco) 0.5%、L-tryptophane (Wako) 0.004%、Bacto-agar (Difco) 2%の割合で最終体積の約半分量の精製水に溶解後、高圧蒸気滅菌（121℃、20分）したものに、また別に 5'-fluoroorotic acid (Wako) 0.1% uracil (Wako) 0.001%の割合で最終体積の残り分の精製水で溶解し、ろ過滅菌したものを加え、十分に攪拌したものを用いた。

Table2

| 10×Dropout solution | |
|---------------------|-------|
| Amino acid | Conc. |
| L-Valine | 0.15% |
| L-Isoleusine | 0.03% |
| L-Arginine-HCl | 0.02% |
| L-Methionine | 0.02% |
| L-Phenylalanine | 0.05% |
| L-Threonine | 0.20% |

2-1-5 YPAD+GEN、YPAD+HYG 培地

Yeast extract (Difco) 1%、Bacto peptone (Difco) 2%、Adenine sulfate (Wako) 0.004%、D-glucose (Wako) 2%、Bacto-agar (Difco) 2%の割合で精製水に溶解後、高圧蒸気滅菌（121℃、20 分）したもの、最終濃度として Geneticin（Wako）200 µg/mL、もしくは Hygromycin B (Wako) 300 µg/mL を無菌的に加えたものを用いた。

2-2 大腸菌

大腸菌は、DH5 α を使い、37℃で培養した。

2-2-1 LB+amp 培地

LB Broth Lennox (Difco) 2%、NaCl (Wako) 0.5%の割合で各試薬を精製水に溶解後、プレートとして使用する場合には Bacto-agar (Difco) 2%を加え、高圧蒸気滅菌（121℃、20 分）を行ったものに、濾過滅菌した Ampicillin (Wako) 50 mg/ml を最終濃度が 75 µg/mL (Wako) となるように加えたものを用いた

第3節 プラスミド

大腸菌からのプラスミド回収には、mini prep (Sigma) を用いた。また、制限酵素は、TaKaRa, TOYOBO, NEB のいずれかの製品を用いた。

3-1 プラスミドの作製

出芽酵母遺伝子のクローニングは以下の方法で行った。GenとるくんTMを用いて野生型酵母細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型として、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) を利用して設計した制限酵素サイト付きのプライマーを用いて、PCRによりORF±約 500 bpを増幅した。

PCR 反応後、マニュアルに従い、pGEM-T Easy vector (Promega) にクローニングした。その後、制限酵素により目的の配列を持つ DNA 断片を精製し、目的のベクターにサブクローニングした。

3-2 DNA 塩基配列決定法

DNA 塩基配列の決定は、Applied Biosystems の ABI PRISM310 Genetic Analyzer を用いて行い、マニュアルにしたがって操作を行った。プラスミド約 100 ng にシーケンス用プライマー2.5 pmol、DNA Sequencing Kit Premix (Applied Biosystems) 4 μ Lを加え、精製水で全量 10 μ Lとして PCR を行った。反応後エタノール沈殿により DNA を回収し、Template Suppression Reagent 20 μ Lに溶解したものを用いて解析を行った。

第4節 破壊株の作製

4-1 遺伝子破壊用またはエピトープタグ導入用 DNA 断片の作製

以下に示した遺伝子破壊用プラスミドをテンプレートとし、*Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) を利用して設計した破壊用プライマーを用いて、PCRにより増幅したDNA断片をエタノール沈殿した後、形質転換に使用した。

| Plasmid for deletion | Marker | Primer sequence |
|----------------------|---------------|---------------------------------|
| pFA6a KANMX6 | <i>KANMX6</i> | FW:--(gDNA)CGTACGCTGCAGGTCGAC |
| pAG32 | <i>HPHMX4</i> | RV:--(gDNA)ATCGATGAATTCGAGCTCG |
| SHB1805 | <i>CgTRP1</i> | FW:--(gDNA)GTTGTAAAACGACGGCCAGT |
| | | RV:--(gDNA)CACAGGAAACAGCTATGACC |

4-2 形質転換

50 mL YPAD 培養液中、25℃で数時間培養し、対数増殖期に達した細胞を遠心した後、pellet 量と同程度の 100 mM lithium acetate (Wako) で懸濁し、25℃で 15 分間インキュベーションした。懸濁液 50 μ L に対し、4-1 で調整した遺伝子破壊用 DNA 断片 5 μ L 及び熱変性サケ精子 DNA (Sigma) 5 μ L を加えて、25℃で 15 分間培養した。これに 250 μ L の 40%PEG/LiAc (50% PEG:1 M lithium acetate:滅菌精製水=8:1:1) を加えて 25℃で 30 分培養した後、42℃で 20 分間熱ショックを与えた。室温で 10 分間静置した後、遠心し、pellet に滅菌精製水 100 μ L 加えたものを栄養選択もしくは薬剤含有プレートに塗布し、30℃または 25℃で 3~4 日間培養した。

4-3 簡易形質転換

酵母細胞へのプラスミドの導入はこの方法で行った。

YPAD 培養液 1mL 中、25℃で一晩培養した細胞懸濁液 500 μ L を遠心し、1 M lithium acetate 1 mL で洗浄した後、1 M lithium acetate 20 μ L を加えた。次に、50%PEG 100 μ L 及び熱変性サケ精子 DNA (Sigma) 5 μ L 及び導入目的のプラスミドを 2 μ L 加えて、25℃で1時間培養した。その後、遠心し、pellet に滅菌精製水 100 μ L 加えたものを栄養選択プレートに塗布し、25℃で3~4日間培養した。

4-4 酵母細胞からのゲノム DNA 抽出

YPAD 培養液 1mL 中、25℃で一晩培養し、stationary phase に達した細胞について、Gen とるくんTM 酵母、グラム陰性菌用 (TaKaRa) を用いて、マニュアルに従いゲノム DNA を抽出した。

4-5 PCR による遺伝子破壊の確認

4-4 で抽出したゲノムDNAをテンプレートとし、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) を利用して設計した確認用プライマーを用いてPCRを行った。反応終了後、反応液に 10×Loading buffer (TaKaRa) を加え、1%アガロースゲルにて電気泳動を行った。泳動終了後ゲルをethidium bromide (EtBr 0.5 μ g/ml) で染色し紫外線照射 (312nm) により増幅したDNA断片を確認した。

第5節 感受性試験

5-1 温度感受性試験

各株を YPAD 培養液 2 mL 中、25℃で 1 日培養し、stationary phase に達した細胞を 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 cells/mL となるように希釈した。YPAD プレートに 10 μ L ずつ滴下し、各 spot が左側から順に 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 cells となるようにした。25℃、30℃、37℃で 4 日間培養した後、写真を撮影した。

5-2 DNA 傷害剤に対する感受性試験

MMS (Aldrich)、Phleomycin (Sigma)、camptothecin (Sigma)、hydroxyurea (Sigma) を適当な濃度になるように含有させた YPAD プレートを用いて 5-1 と同様に spot し、25℃、30℃で 3~5 日間培養した後、写真を撮影した。

5-3 5-FOA 含有プレート上での生育試験

各株を適当な培地上で培養し、96 穴プレートに入れた精製水に懸濁した。その後 OD 測定により細胞濃度を決定し、細胞を 2×10^7 、 6×10^6 、 2×10^6 、 6×10^5 、 2×10^5 、 6×10^4 、 2×10^4 、 6×10^3 cells/mL となるように希釈した。1 mg/mL の 5-FOA を含む SC プレートに 5 μ L ずつ滴下し、各 spot が左側から順に 1×10^5 、 3×10^4 、 1×10^4 、 3×10^3 、 1×10^3 、 3×10^2 、 1×10^2 、 3×10 cells となるようにした。25℃、で 3~5 日間培養した後、写真を撮影した。

第6節 細胞周期同調

6-1 Nocodazole による同調

目的の株を 25℃で 1 日培養した。その後細胞が log phase になるように細胞を希釈し 3 時間培養した。その細胞を 1×10^7 cells/mL になるよう調節し Nocodazole の final の濃度が 15 μ g/mL となるように加え 3 時間同調させた。同調を解除する時は 1mL の YPAD で 3 回洗浄し同調を解除した。

6-2 α -factor による同調

目的の株を 25℃で 1 日培養した。その後細胞が log phase になるように細胞を希釈し 3 時間培養した。その細胞を 1×10^7 cells/mL になるよう調節し α -factor の最終の濃度が 100 ng/mL となるように加え 4 時間同調させた。同調を解除する時は 1mL の YPAD で 3 回洗浄し同調を解除した。

第7節 FACSscan

回収したサンプルを 70%エタノールで 12 時間、4℃に放置した後集菌し、それを 50 mM sodium citrate (Wako) (pH7.4) にて 1 回洗浄した。その後 100 μ g/mL の RNaseA (Wako) を 400 μ L 加え、37℃で 4 時間加温した。そのサンプルを超音波処理し、Propidium iodide (PI) Sodium citrate 溶液を 8 μ g/mL となるように加えてアルミホイルで遮光し、室温で 1 時間放置した。そして、そのサンプルをナイロンメッシュに通し、FACSscan (BECTON DICKINSON) で細胞の蛍光強度を測定した。

第8節 Western blotting 法

9-1 タンパク質抽出

1~2×10⁷ 細胞を精製水で洗浄後、精製水 100 μL、0.2M NaOH 100 μL を加えて室温で 5 分間静置することにより、細胞壁を粉砕した。この反応液を遠心し、上清を取り除き、50 μL の 1×Sample buffer を加えてタンパク質溶液とした (Kushnirov VV 2000)

9-2 SDS-PAGE

目的のタンパク質の大きさに応じて、Running gel (6~15% acryl amide、350 mM Tris-HCl pH8.8、0.1% SDS、0.1% ammonium persulfate (APS))を調製した後、最終濃度が 0.01%となるように N', N', N', N',-tetramethylethylenediamine (TEMED) を加え、速やかにゲル版に流し込んだ。Running gel が固化した後、同様にして Stacking gel (4% acryl amide、130 mM Tris-HCl pH6.8、0.1% SDS、0.1% APS) を Running gel の上に重層し、コームを差して固化させた。

9-1 で得られたタンパク抽出液を 100℃で 3 分加熱後、十分にボルテックスし、Runnning buffer (25 mM Tris、1.44% Glycine、0.1% SDS) を満たした電気泳動装置 (BioRad) にアプライした。ゲル版一枚あたり 20 mA の定電流で泳動を行った。

9-3 Western blotting

SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後、Wet 式 blotting 装置を用いて 30V で一晩かけて Hybond P membrane (Amersham Bioscience) 上に移した (Blotting buffer-20% methanol、25 mM Tris、1.44% Glycine、0.1% SDS)。その後、membrane を Blocking buffer (5% skim

milk、0.1% NaN₃、0.05% Tween-PBS) に浸し、室温で 1 時間インキュベートした。0.05% Tween-PBS でよく洗浄した後、一次抗体溶液 (α -13myc, $\times 1000$; α -HA;12CA5 mouse IgG (Roche)) に浸し、室温で 1 時間インキュベートした。0.05% Tween-PBS でよく洗浄した後、HRP 標識二次抗体溶液 (Anti mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology), $\times 2000$) に浸し、室温で 1 時間インキュベートした。0.05% Tween-PBS でよく洗浄した後、PBS で洗浄した。発色には ECLTMKit を用いてマニュアルに従い Medical Film (Konica) で検出した。

第9節 パルスフィールドゲル電気泳動

9-1 MMS 処理

各株を YPAD 培養液 10mL で 25°C 1 日培養後、対数増殖期になるように希釈した細胞懸濁液に最終濃度として 0.1% になるように MMS を加えた。MMS で 30 分処理した後 10% Na₂S₂O₃ (Wako) を加えることで MMS を失活させた。その後、滅菌精製水で洗浄し、新しい YPAD 培養液で培養した。各時間で細胞数を測定し、 8×10^7 細胞を採取した。採取した細胞懸濁液を滅菌精製水で洗浄した後、70% ethanol (Wako) 溶液で細胞を固定し、4°C で 12~24 時間静置した。

9-2 ゲノム DNA の調整

サンプルを遠心分離し、上清を除去した後、50 mM EDTA (pH 8.0) 500 μ L で細胞を洗浄した。50 mM EDTA (pH 8.0) 50 μ L に懸濁し、2.5 mg/mL Zymolyase 6 μ L (final: 0.15 mg/mL) と 2% low melting agarose 40 μ L (final: 0.75%) を 50°C で穏やかに混合した後、mold に入れて 4°C で 1 時間放置した。mold から取り出し、1 mL

の LET buffer 中、37℃で 16 時間反応させた。その後、ESP buffer に置換し、50℃で 16 時間反応させた。TE (pH 9.0) 2mL で 3 時間洗浄し、これを 3 回繰り返した後、1 mL の TE (pH 9.0) に置換して 4℃で保存した。ゲノム DNA の調整と電気泳動条件は Hiraoka (2000) らの方法を用いた。

LET buffer: 0.5 M EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7.5% 2-mercaptoethanol

ESP buffer : 0.5 M EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1 mg/mL Proteinase K, 1% SLS

第10節 Micrococcal nuclease digestion assay

Kent and Mellor (1995) に準ずる方法で行った。各株を YPAD 培養液 100 mL で 25℃で対数増殖期まで培養し、細胞を遠心により回収し、500 μ L の滅菌精製水、1 M D-sorbitol (ナカライテクス) で洗浄後、960 μ L の YLE buffer (1 mg/mL Zymolyase (生化学工業), 1 M D-sorbitol, 0.2% (v/v) 2-mercaptoethanol (SIGMA)) に細胞 (1.2×10^9) を懸濁し、37℃で 30 分インキュベートした。遠心によりスフェロプラストを回収し、700 μ L の 1 M D-sorbitol で穏やかに 2 回洗浄し、980 μ L の spheroplast digestion buffer (1 M D-sorbitol, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.04% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.5 mM spermidine, 0.075% Nonidet P40) に懸濁した。200 μ L 分の MNase 未処理サンプルを回収した後、8 μ L の 200U/ml MNase (Sigma) を加え (終濃度 2 U/mL) 37℃でインキュベートし、2, 5, 10, 20 分後に 200 μ L ずつ 20 μ L の stop solution (5% SDS, 250 mM EDTA) を含むチューブにサンプルを回収した。回収した DNA を、フェノール/クロロホルム抽出により精製し、エタノール沈殿し、1.5% agarose 0.5×TBE gel で電気泳動し、エチジウムブロマイドにより DNA バンドを可視化した。

謝辞

本研究を進めるにあたり、数々の御指導御鞭撻を賜りました、東北大学大学院薬学研究科 遺伝子薬学分野教授 榎本 武美 先生に謹んで御礼申し上げます。

本論分を作成するにあたり、副査として有益なご助言、ご協力を頂きましたと東北大学大学院薬学研究科 生体防御薬学分野准教授 久下 周佐 先生に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始多大な御指導、ご協力を頂きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野准教授 関 政幸 先生に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、始終有益なる御指導並びに御助言を頂きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野博士課程 川嶋 聡様に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、共同研究者として数々の御助言、御協力を頂き、加えて実験材料を分与して頂きました東京大学分子細胞生物研究所 堀越 正美 先生に心より感謝致します。

様々なご助言、ご協力を頂いた東京大学分子細胞生物研究所 発生分化構造研究分野の皆様 に心より感謝いたします。

最後になりましたが、研究のみならず、様々な御助言、御協力を頂きました東北大学大学院薬学研究科 遺伝子薬学分野助教 多田 周右先生、吉村 明先生をはじめとする遺伝子薬学分野の皆様 に心より感謝致します。皆様のさらなる御活躍をお祈りし、これを謝辞と致します。

参考文献

Barbera AJ, Chodaparambil JV, Kelley-Clarke B, Joukov V, Walter JC, Luger K, Kaye KM. The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. (2006) Science. 311: 856-861.

Chakravarthy S, Bao Y, Roberts VA, Tremethick D, Luger K. Structural characterization of histone H2A variants. (2004) Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 69: 227-234.

Chimura T, Kuzuhara T, Horikoshi M. Identification and characterization of CIA/ASF1 as an interactor of bromodomains associated with TFIID. (2002) Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 9334-9339.

Clarkson MJ, Wells JR, Gibson F, Saint R, Tremethick DJ. Regions of variant histone His2AvD required for Drosophila development. (1999) Nature. 399: 694-697.

Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. (2007) Nature. 447: 951-958.

Faast R, Thonglairoam V, Schulz TC, Beall J, Wells JR, Taylor H, Matthaei K, Rathjen PD, Tremethick DJ, Lyons I. Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. (2001) Curr Biol 11: 1183-1187.

Iouzalén N, Moreau J, Méchali M. H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 3947-3952.

Guillemette B, Bataille AR, Gévry N, Adam M, Blanchette M, Robert F, Gaudreau L. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. (2005) *PLoS Biol.* 3: e384.

Guillemette B, Gaudreau L. Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. (2006) *Biochem Cell Biol.* 84: 528-535.

Jackson JD, Gorovsky MA. Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 3811-3816.

Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R. (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science.* 26 : 1422-1425.

Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, Madhani HD, Rine J. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. (2004) *PLoS Biol.* 2 : E131.

Krogan NJ, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Ryan OW, Ding H, Haw RA, Pootoolal J, Tong A, Canadien V, Richards DP, Wu X, Emili A, Hughes TR, Buratowski S,

Greenblatt JF. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. (2003) *Mol Cell*. 12: 1565-1576.

Krogan NJ, Baetz K, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Kwok TC, Thompson NJ, Davey MG, Pootoolal J, Hughes TR, Emili A, Buratowski S, Hieter P, Greenblatt JF. Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 13513-13518.

Li B, Pattenden SG, Lee D, Gutiérrez J, Chen J, Seidel C, Gerton J, Workman JL. Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 18385-18390.

Liu X, Li B, Gorovsky MA. Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. (1996) *Mol Cell Biol*. 16: 4305-4311.

Luk E, Vu ND, Patteson K, Mizuguchi G, Wu WH, Ranjan A, Backus J, Sen S, Lewis M, Bai Y, Wu C. Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. (2007) *Mol Cell*. 25: 357-368.

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. (1997) *Nature*. 389: 251-260.

Matangkasombut O, Buratowski RM, Swilling NW, Buratowski S. Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. (2000) *Genes Dev.* 15 : 951-962.

Matangkasombut O, Buratowski S. (2003) Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol Cell.* 11 : 353-363.

Matsubara K, Sano N, Umehara T, Horikoshi M. Global analysis of functional surfaces of core histones with comprehensive point mutants. (2007) *Genes Cells.* 12: 13-33.

Millar CB, Xu F, Zhang K, Grunstein M. Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. (2006) *Genes Dev.* 20 : 711-722.

Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. (2004) *303: 343-348.*

Nakanishi S, Sanderson BW, Delventhal KM, Bradford WD, Staehling-Hampton K, Shilatifard A. A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. (2008) *Nat Struct Mol Biol.* 15: 881-888. .

Raisner RM, Hartley PD, Meneghini MD, Bao MZ, Liu CL, Schreiber SL, Rando OJ, Madhani HD. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. (2005) *Cell*. 123: 233-248.

Raisner RM, Madhani HD. Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. (2006) *Curr Opin Genet Dev*. 16: 119-124.

Ridgway P, Brown KD, Rangasamy D, Svensson U, Tremethick DJ. Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus laevis* development. (2004) *J Biol Chem*. 279: 43815-43820.

Shen X, Ranallo R, Choi E, Wu C. Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. (2003) *Mol Cell*. 12: 147-155.

Suto RK, Clarkson MJ, Tremethick DJ, Luger K. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. (2000) *Nat Struct Biol*. 12: 1121-1124.

Kushnirov VV. Rapid and reliable protein extraction from yeast. (2000) *Yeast*. 16: 857-860.

West MH, Bonner WM. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. (1980) *Biochemistry*. 19: 3238-3245.

Wu WH, Alami S, Luk E, Wu CH, Sen S, Mizuguchi G, Wei D, Wu C. Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. (2005) *Nat Struct Mol Biol.* 12: 1064-1071.

Wu WH, Wu CH, Ladurner A, Mizuguchi G, Wei D, Xiao H, Luk E, Ranjan A, Wu C. N-terminus of Swr1 binds to histone H2AZ and provides a platform for subunit assembly in the chromatin remodeling complex. (2008) *J Biol Chem.* [Epub ahead of print]

Zhang H, Roberts DN, Cairns BR. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. (2005) *Cell.* 123: 219-231.

Zlatanova J, Thakar A. H2A.Z: view from the top. (2008) *Structure.* 2008 16: 166-179.

Zhou J, Fan JY, Rangasamy D, Tremethick DJ. The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. (2007) *Nat Struct Mol Biol.* 14: 1070-1076.